

TC
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

RESVERATROL'ÜN
DIŞI SIÇANLARDA OLUŞTURDUĞU
ESTROJEN MODÜLATÖRÜ ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

DR. FİKRİYE YASEMİN ÖZATİK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. KEVSER EROL

ESKİŞEHİR

Nisan 2011

TC
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

RESVERATROL'ÜN
DİŞİ SIÇANLARDA OLUŞTURDUĞU
ESTROJEN MODÜLATÖRÜ ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

DR. FİKİRİYE YASEMİN ÖZATİK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. KEVSER EROL

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Fikriye Yasemin Özatik'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "RESVERATROL'ÜN DIŞI SIÇANLARDA OLUŞTURDUĞU ESTROJEN MODÜLATÖRÜ ETKİLERİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih
29.4.2011

Prof. Dr. Kevser EROL
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. M. İpek CİNGİ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ece GENÇ
Yeditepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Başar SIRMAGÜL
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .05.05.2011...tarih ve .876/4043..sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Özatic, FY. Resveratrolün dişi sıçanlarda oluşturduğu estrogen modülatörü etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. Eskişehir, 2011. Çalışmamızda resveratrolün dişi sıçanlarda oluşturduğu estrogenik etkiler incelenmiştir. Çalışmamız iki aşama olarak planlanmıştır. 1.Aşamada resveratrolün immatür (21 günlük) dişi sıçanlarda oluşturduğu estrogenik etkileri, 2.aşamada ise 4-vinil siklohekzen (VCD) enjeksiyonu ile primer over yetmezliği (POY) oluşturduğumuz puberte dönemindeki (28 günlük) dişi sıçanlarda oluşturduğu estrogenik etkileri incelenmiştir. Tüm aşamalarda estrogen reseptörlerinin (ER) olduğu bilinen dokularda resveratrolün agonist ve/veya antagonist etkileri çeşitli parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Bu parametreler uterus ağırlığı/vücut ağırlığı oranları (UA/VA), uterus kuru ağırlığı/uterus yaş ağırlığı oranları (UKA/UYA), vücut ağırlığı (VA) artış oranları, kemik dansitometresi, serum estradiol ve vitamin D değerleri ölçümleridir. İmmatür sıçanlarda UA/VA oranları değerlendirmesinde resveratrol UA/VA oranını 17alfa etinil estradiol (17alfa EE) e benzer bir şekilde artırmıştır. En düşük anlamlı etki 10 mg/kg resveratrol (RES10) dozunda görülmüştür. Bu etki tamoksifen (TMX) ile azalmazken fulvestrant (FLV) ile anlamlı bir şekilde antagonize edilmiştir. POY oluşturulmuş dişi sıçanlarda da tamoksifen, resveratrolün etkilerini tamamen ortadan kaldırmamıştır. UA/VA değerleri açısından POY geliştirilmiş sıçanlarda VCD+RES10+TMX verilen grubun ortalama değerlerinin, VCD+RES10 verilen grubun ortalama değerlerinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Estradiol sonuçları değerlendirildiğinde 20 mg/kg dozda resveratrolün (RES20) estradiol düzeyini düşürdüğü gözlenmektedir. POY geliştirilmiş sıçanlarda estradiol değerleri incelendiğinde, VCD+RES10+TMX ve VCD+17beta Estradiol (17beta E) verilen gruplarda estradiol değerlerinin kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı gözlenmektedir. Sonuç olarak bu çalışmanın en önemli bulgusu, estrogenik aktivite açısından resveratrolün dozunun önemli olduğudur. Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlara göre resveratrolün estrogen modülatörü olarak etki gösterdiği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Estradiol, estrogen, fulvestrant, resveratrol selektif estrogen reseptör modülatörü (SERM), tamoksifen, 4-vinil siklohekzen (VCD),

ABSTRACT

Ozatic, FY. Estrogen modulator effects of Resveratrol on female rats. Eskisehir Osmangazi Universitesi Health Sciences Institute Pharmacology Department Doctoral Thesis. Eskisehir, 2011. In the present study, the estrogenic effects of resveratrol were investigated in female rats. In the first step, the estrogenic activity of resveratrol was investigated in immature (21 days old) female rats; and in the second step, the estrogenic activity was investigated in pubertal female rats (28 days old) with primary ovarian failure (POF) induced by 4-Vinyl cyclohexene (VCD) injection. The agonistic or antagonistic activities of resveratrol were evaluated by using several parameters in the tissues which have estrogenic receptors. These parameters are the rates of uterine weight/body weight (UW/BW), uterine dry/wet weight (UDW/UWW), the increased ratio of body weight, bone densitometer measurements, the levels of serum estradiol and vitamin D. It was found that resveratrol increased the ratio of UW/BW as much as those of 17 alpha ethynyl estradiol (17alphaEE). The least significant activity was obtained with 10 mg/kg resveratrol (RES10). This activity was not decreased by tamoxifen but was decreased by fulvestrant. Tamoxifen did not antagonize the effects of resveratrol completely in female rats with POF.

The ratio of UW/BW in the group (VCD+RES10+TMX) was less than that in the group (VCD+RES10) with POF. Resveratrol decreased estradiol levels at 20 mg/kg dose. It was found that the levels of estradiol were significantly higher in the groups VCD+RES10+TMX and VCD+17beta Estradiol (17betaE) than control. In conclusion, the most important result of this study is the dose of resveratrol in its estrogenic activity. It can be thought that resveratrol may have estrogenic modulatory activity.

Key words: Estradiol, estrogen, fulvestrant, resveratrol selektif estrogen receptor modulators (SERM), tamoxifen, 4-vinyl cyclohexene (VCD),

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2-1-Resveratrol	3
2-2-Estrojen	13
2-3-Primer Over Yetmezliği (POY)	18
2-4-Vinil Siklohekzen Diepoksit (VCD)	20
3-GEREÇ VE YÖNTEM	23
3-1-Hayvanlar	23
3-2-Deneylerde kullanılan kimyasal farmakolojik maddeler ve dozları	23
3-3-Deneylerde Kullanılan Cihazlar	23
3-4-Deneylerde Kullanılan Kitler	24
3-5-Deney Protokolü	24
3-6-İstatistiksel Değerlendirme	29
4-BULGULAR	30
4-1-Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları	30
4-2-Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları	34
4-3-Vücut Ağırlığı Artış Oranları	36
4-4-Histolojik Bulgular	38
4-5-Kemik Dansitometre Bulguları	51
4-6-Kan Analizi Bulguları	52

5-TARTIŞMA	55
6-SONUÇ ve ÖNERİLER	60
7-KAYNAKLAR	61

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Resveratrol biyosentezi	3
Şekil 2. Trans-ve sis resveratrolün kimyasal yapısı	4
Şekil 3. Resveratrol ve dietilstilbesterol	8
Şekil 4. SIRT-1 karaciğerde yağ asidi oksidasyonu ve glukoneogenez	10
Şekil 5. Tamoksifen	17
Şekil 6. Fulvestrant	18
Şekil 7. Artan yaşla birlikte sağlıklı ve azalmış ovaryan rezerv ve ovaryan ve hipotalamopitütüer hormon konsantrasyon değişimleri	20
Şekil 8. İmmatür Sıçanlarda Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları	30
Şekil 9. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Uterus/Vücut ağırlığı Oranları	32
Şekil 10. İmmatür Sıçanlarda Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları	34
Şekil 11. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları	35
Şekil 12. İmmatür Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Artış Oranları	36
Şekil 13. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Oranları	37
Şekil 14. İmmatür Sıçanlarda Histolojik Skorlar	38
Şekil 15. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Histolojik Skorlar	40
Şekil 16. Kontrol grubunda uterus histolojik incelemesi.	42
Şekil 17. 17alfa EE grubunda uterus histolojik incelemesi.	42
Şekil 18. RES2+17alfaEE grubunda uterus histolojik incelemesi	43
Şekil 19. 17alfa EE+TMX grubunda uterus histolojik incelemesi	43

Şekil 20. RES10+TMX grubunda uterus histolojik incelemesi	44
Şekil 21. 17alfa EE+FLV grubunda uterus histolojik incelemesi	44
Şekil 22. RES10+FLV grubunda uterus histolojik incelemesi	45
Şekil 23. Kontrol (DMSO) grubunda uterus histolojik incelemesi	45
Şekil 24. Kontrol (DMSO) grubunda over histolojik incelemesi	46
Şekil 25. VCD grubunda uterus histolojik incelemesi	46
Şekil 26. VCD grubunda over histolojik incelemesi	47
Şekil 27. VCD+17 alfa grubunda uterus histolojik incelemesi	47
Şekil 28. VCD+17 alfa grubunda over histolojik incelemesi	48
Şekil 29. VCD+RES10 grubunda uterus histolojik incelemesi	48
Şekil 30. VCD+RES 10 grubunda over histolojik incelemesi	49
Şekil 31. VCD+RES10+TMX grubunda over histolojik incelemesi	49
Şekil 32. VCD+17beta E grubunda uterus histolojik incelemesi	50
Şekil 33. VCD+17 beta E grubunda over histolojik incelemesi	50
Şekil 34. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Kemik Dansitometre Bulguları	51
Şekil 35. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda 25 Hidroksi Vitamin D Değerleri	52
Şekil 36. İmmatür Sıçanlarda Estradiol Değerleri	53
Şekil 37. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Estradiol Değerleri	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPK	5'AMP aktive eden protein
COX-2	Siklooksijenaz 2
E2	Estradiol
EE2	Etinilestradiol
eNOS	Endotelial Nitrik Oksid Sentaz
ER	Estrojen Reseptörleri
FOX-01	Forkhead Box
HPLC	Yüksek Performans Likit Kromatografi
IL-6	İnterlokün 6
LDL	Düşük Dansiteli Lipoproteinlerde
PCG-1- α Alfa	Peroxisom Proliferatör ve Aktivatörü Reseptör Gamma Co-Aktivatör 1
POY	Primer Over Yetmezliği
SERM	Selektif Estrojen Reseptör Modulatörleri
TNF α	Tümör Nekrosis Faktör alfa
VCD	Vinilsikloheksen Diepoksit
VCH	4-vinylcyclohexene
ZEA	Zearalenone

1-GİRİŞ

Resveratrol (trans-3,4',5,-trihidroksistilben) bitkilerde bulunan polifenolik bir moleküldür (68). Botanik olarak resveratrol bir fitoaleksinin gibi aktivasyon gösterir. Bitkilerde yaralanmalara, mantar ve virüs saldırılarına cevap olarak üretilir (20). İnsan sağlığı üzerinde pek çok faydalı etkilerinin olduğu tespit edilmiş ve hala araştırılmaktadır (20,68). Resveratrolün majör biyolojik aktiviteleri arasında; Lipid peroksidasyon inhibisyonu, platelet agregasyon inhibisyonu, antiinflamatuvar aktivite, damar gevşetici etkileri, lipid metabolizmasını modüle edici etkileri, kanser önleyici etkileri, estrojenik etkileri ve daha pek çoğu sayılabilir (20).

Resveratrol bir fitoestrojendir. Fitoestrogenler, selektif estrojen reseptör modülatörleri (SERM) arasında sınıflandırılmaktadır (59). SERM'ler bazı dokularda (meme, uterus) antiestrojenik aktivite gösterip, bazı dokularda da (kemik, beyin, kardiyovasküler hücreler) estrojenik etkiler gösterebilen bileşikler olarak bilinirler (55). Tamoksifen bu özelliklere sahip SERM'lerin birinci kuşak üyesidir. Diğerleri toremifen, raloksifen, droloksifen, idoksifen, levomeloksifendir. Resveratrol doğal SERM'ler grubunda bulunmaktadır.

Fitoestrogenler yapısal bakımdan memeli estrojenlerine ve estradiole benzerler. Estrojen reseptörlerine (ER) bağlanırlar özellikle ER β ya ilgi duyarlar (3). Kendi aralarında flavonoidler, lignanlar, kumestanlar ve stilbenler olarak gruplanırlar. Resveratrol bu gruplar arasında stilbenler grubuna dahildir (59).

Doğal estrojenlerin uterus, meme, overler, testis, karaciğer, kemik gibi farklı dokularda etkileri bulunmaktadır. Estrojenler bu etkilerini nükleer ER'lerine bağlanarak gerçekleştirirler. ER α ve ER β olarak bilinen iki ER bulunmaktadır. ER'leri aynı hücrelerde lokalize olabilmelerine karşın, farklı dokularda dağılım gösterirler ve agonist ve antagonist olan moleküller üzerinden farklı etkileri bulunmaktadır (3).

Resveratrolün bir estrojen agonisti mi ya da bir estrojen antagonisti mi olduğu halen açıklığa kavuşmamıştır (14). Bazı kaynaklar resveratrolün agonist (24,80) etkilerinden söz ederken bazıları ise antagonist etkileri üzerinde durmaktadırlar (6,48).

Menopozda ve primer over yetmezliğinde (POY), endojen ve ekzojen estrogenler yaygın olarak hormon replasman tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ancak estrogenlerin kullanımıyla meme ve uterus kanserinde bir artış söz konusudur. Postmenopozal dönemdeki pek çok kadın bu nedenle estrogen kullanımından kaçınmaktadırlar. SERM'ler postmenopozal tedavide yeni bir alternatif olabilir. Çünkü SERM'ler kemik fonksiyonlarını düzeltirler bununla birlikte de meme ve uterus kanseri için de minimal bir risk söz konusudur (55).

Vinilsiklohekzen diepoksit (VCD) in kimyasal formülü $C_8H_{12}O_2$ dir. Molekül ağırlığı 140,20 mg'dır. Çeşitli lastik, plastik, kauçuk ve böcek ilacı yapımında üretilen 1,3-bütadien dimerizasyon formuna 4-vinylcyclohexene (VCH) adı verilmektedir. VCD, VCH'nin metabolitidir. Sigara ve kömür dumanında bulunur. VCD'nin dişi sıçanların oositlerinde primer ve primordial folliküllerde hasar oluşturan tek kimyasal olduğu kanıtlanmıştır (34). Ayrıca bu amaçla yapılan pek çok araştırmada bulunmaktadır (29,34,78).

Çalışmamızda bir SERM olarak resveratrolün dişi sıçanlarda, ER'lerinin bulunduğu bilinen dokularda etkilerini araştırması hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışma iki aşamada gerçekleştirmiştir.1. aşamada 21 günlük immatür dişi sıçanlarda resveratrolün vücut ağırlığı, uterus, kemik ve kanda yaptığı değişiklikler incelenmiştir.2.Aşamada ise VCD ile primer over yetmezliği(POY) oluşturduğumuz 28 günlük dişi sıçanlarda resveratrolün aynı parametrelerde ve overde yaptığı değişiklikleri incelenmiştir. Bu değişiklikler estrogen agonisti ve/veya antagonisti olduğu bilinen 17alfa Estradiol, 17beta Estradiol, tamoksifen, fulvestrant gibi bileşiklerle karşılaştırılmıştır. Bu şekilde resveratrolün, agonist mi veya antagonist mi olduğu ya da agonist/antagonist özelliğe mi sahip olduğu sonucuna ulaşmaya çalışılmıştır.

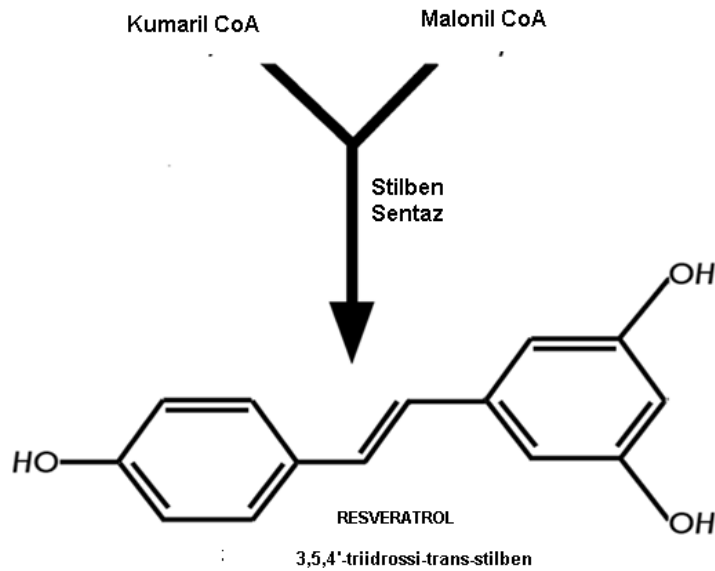
2-GENEL BİLGİLER

2-1-Resveratrol

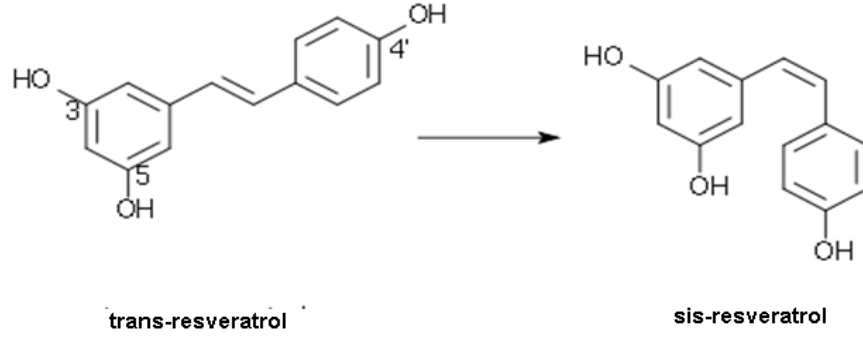
Resveratrol (trans-3,4',5,-trihidroksistilben) (Şekil=1) bazı bitkilerde bulunan bir polifenolik moleküldür (68). Bu bitkiler üzüm, yer fıstığı, yabanmersini, böğürtlen, kızılçık, kuşburnu, ahududu gibi bitkilerdir (68). Bir kimyasal antite olarak resveratrol 40'lı yıllardan bu yana bilinir. İlk defa Polygonum cupsidatum adlı bitkiden izole edilmiştir (65). Botanik olarak resveratrol bir fitoaleksin gibi aktivasyon gösterir. Resveratrolün biyolojik olarak aktif olan formu, trans resveratroidür. Resveratrolün trans formunun yanı sıra sis ve glikozid formu olan piecid formu da vardır.

2-1-1-Resveratrolün biosentezi

Resveratrol biosentezini stilben sentaz enzimi kataliz eder. Resveratrol biosentezi p-kumarol-CoA'nın p-kumarol kalıntısı ile malonil CoA'dan üç adet C2 alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondansasyon yolu ile oluşur. Daha ileri reaksiyonları resveratrolün bifenolik halkasının 3.pozisyonunda glikozil ya da sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır (70).



Şekil 1. Resveratrol biosentezi (33)



Şekil 2. Trans-ve sis resveratrolün kimyasal yapısı (33)

2-1-2. Resveratrol, bir bitki fitoaleksini

Bitkiler sekonder metabolitler olarak bilinen milyonlarca düşük molekül ağırlıklı doğal maddeler içerirler (14). Bu moleküller bitki direncinde etkilidirler.

Bunlar bitkilere karşı parazitik saldırılar ve soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi stres altındaki durumlardan korunmak için bitkiler tarafından üretilen maddelerdir (46,65).

Antimikrobiyal sekonder moleküllerin bilinen iki sınıfı vardır.

1-Fitoaleksinler

2-Fitoantisipinler

Resveratrol bir fitoaleksindir. Çeşitli bitki türlerinde ve bazı üzümde üretilir. Üzümdeki konsantrasyonu 50 ile 400 µg/kg arasında değişen oranlardadır. Fitoaleksin aynı zamanda üzüm ve benzer meyvelerin odunsu dokusundan da sentezlenir. Resveratrol konsantrasyonunun üzüm gibi meyvelerin kabuğu ile meyvesi karşılaştırıldığında kabukta daha yüksek olduğu saptanmıştır. Resveratrolün tüm formları kırmızı üzümde yeşil üzümdekinden daha fazla oranda bulunmaktadır (27).

Kırmızı şarapta Resveratrolün yüksek konsantrasyonda bulunmasının sebebi üzümün kabuğunun küf ile uzun süre temas etmesidir (14).

Resveratrolün ilk tespiti, Fransız mutfağının yüksek miktarda doymuş yağ içermesi, kolesterolden zengin bir beslenme şekli izlemesi ve yoğun sigara tüketimi olmasına rağmen Bordeaux kesiminde yaşayan insanlarda kalp hastalıklarının çok az görülmesi, araştırmacılar tarafından “Fransız Paradoksu” adını verdikleri değerlendirme ile başlamıştır. Bu bölge oldukça rutubetlidir. Dolayısı ile bu bölgede yetişen “Cabernet Sauvignon” cinsi üzümlerin kabuğunda oluşan küf mantarına karşı kabukta oluşan resveratrol adlı maddenin, yüksek kalorili ve yüksek yağ oranlı yiyecekler tüketildiği halde kalp hastalıklarına karşı koruyucu olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesinden David A. Sinclair bu buluşu “100 bin yıldan beri beklenen bir keşif” olarak nitelendirilmiştir (8,57,61).

2- 1-3. Resveratrolün farmakolojik aktiviteleri

Bazı in vitro çalışmalarda resveratrol ün pek çok etkileri üzerinde durulmuştur. Resveratrol farmakolojik olarak oldukça geniş bir aktiviteye sahiptir. Bunlardan en iyi bilinenler arasında antioksidan, antiinflamatuvar, analjezik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, vasküler hücrelerde adezyon önleyici ve yaşlanmayı önleyici etkileri bulunur (12,15).

Resveratrolün aynı zamanda antitümör aktivitesi de bulunur. Özellikle kolorektal kanserlerde bu özellik çok belirgindir (85). Resveratrol aynı zamanda Alzheimer hastalığının sürecini yavaşlatmada ve hastalığın ilerlemesini geciktirmede de etkili bulunmuştur (8,12). Batıda yaşayan insanlarda obezite kontrolü artık oldukça zor olmaya başlamıştır. Resveratrol bu bölgelerde kilo kontrolü için doğal ürünler satan marketlerde yerini almıştır (12).

2-1-4.Resveratrolün antioksidan aktivitesi

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki normal işlemler sırasında bazı etmenlerin de etkisi ile reaktif oksijen radikalleri oluşmaktadır. Oluşan reaktif oksijen formları eğer engellenmez ise DNA, protein, lipid ve karbonhidratlarda yapısal bozulmalara yol açmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri hücre membranının

yapısını ve fonksiyonunu bozarak dejeneratif hastalıklara yol açar. Antioksidanlar reaktif oksijen oluşumunu engelleyerek veya oluşan reaktif oksijenleri süpürerek oksijenin neden olduğu zararları hücresele düzeyde engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır (79).

Canlılardaki kimyasal süreçler ve bunlardan özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller farklı moleküller ile reaksiyona girebilirler. Bu yolla hücrelere zarar verebilirler. Antioksidanlar serbest radikaller ile reaksiyona girerek bu süreci önler. Bu özellikleri ile hücrelerin değişime uğramasını engeller ve dolayısı ile tümör oluşumuna da engel olmuş olurlar. Antioksidan özelliği olan birçok madde vardır. Bu maddelerin bazıları diyetle alınır, bazıını da vücut kendisi oluşturur.

Vücudun serbest radikallere karşı kendisini savunmak için ürettiği antioksidanlar katalaz, glutatyon peroksidaz, dismutaz gibi enzimlerdir. Diyetle alınan antioksidanlar ise vitamin C, E karotenoidler ve fenolik maddelerdir. Fenolik maddeler tahıl, sebze, meyve ve baharatlarda bulunur. Kırmızı şarap da bu fenolik maddelerden zengin bir içecektir. Flavonoidlerin de dahil olduğu bu fenolik maddelerin özellikleri arasında antioksidan olması, serbest radikalleri temizleme, hidrolitik ve oksidatif enzimleri inhibe etme, enfeksiyon önleyici aktivitelerinin bulunması sayılabilir (79,86). Resveratrol de bir flavonoid olarak antioksidan özelliğini bu yolla göstermektedir. Oksidatif hasar kardiyovasküler hastalıklar ve kanserin başta olduğu pek çok hastalıkta oluşmaktadır.

Trans resveratrolün kalp hastalıkları ve kansere karşı koruyucu olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Frankel ve arkadaşları, ilk defa resveratrolün düşük dansiteli lipoproteinlerde (LDL) bakırın katalize ettiği oksidasyonu azalttığını bulmuşlardır (21). Domuzlarda yapılan bir çalışmada, LDL oksidasyonu sırasında çoklu doymamış yağ asitlerinin yıkım ürünlerinin oluşumu ölçülerek, trans-resveratrolün daha çok bakırı bağlayarak etki gösterdiği oysa diğer flavonoidlerin serbest radikaller için daha iyi bir temizleyici olduğu görülmüştür (5). Resveratrolün bakır katalizli oksidasyon sırasında diğer flavonoidlere göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir (21). Resveratrolün bakırı bağlama kapasitesinin yüksek olması in vivo olarak önemlidir.

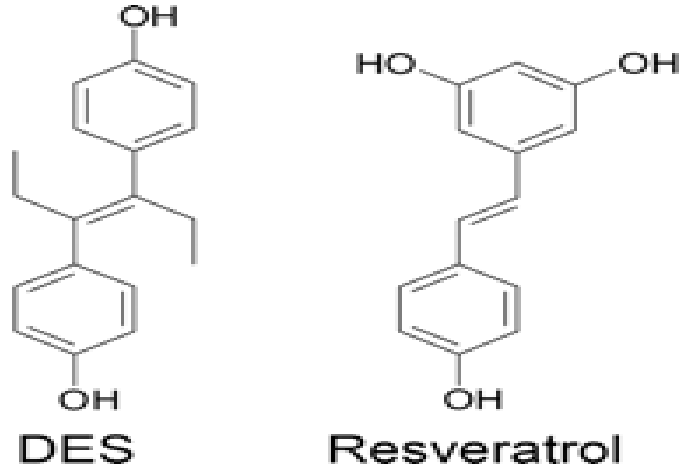
Çünkü LDL'nin bakır bağlama kapasitesi yüksektir. Bakır bağlama açısından resveratrolün trans formu cis formuna göre iki kat daha yüksektir. Bunu sağlayan resveratroldeki hidroksil (-OH) grubunun pozisyonudur.

Resveratrol yaşayan hücrelerde oksidatif strese bağlı gelişen zararlı etkileri azaltır. Sun ve arkadaşları (77) PC12 (sıçan adrenal feokromositoma hücreleri) hücrelerinde demir ve etanol tarafından oluşan lipid peroksidasyonunda resveratrolün etkilerini araştırmışlardır. Bu hücreler dopaminerjik nöronal hücreler için bir model kabul edilebilir. Bu hücreler serbest radikallere ve hafif metal iyonlarına karşı duyarlıdır. Araştırmacılar bu hücrelerin resveratrol ile peroksidatif stresten ve doku hasarından korunduğunu bulmuşlardır. Buna ek olarak Chantıvayapongs ve arkadaşları (11), trans-resveratrol ve vitamin C ve/veya E kombinasyonunun bu üç antioksidanı tek başına vermektten daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlar resveratrolün sadece antioksidan ve antimitojen özellikleri olmadığı aynı zamanda hücre ölümünü de azalttığı yönündedir. PC12 hücrelerine resveratrol ve vitamin C ve E gibi antioksidanların eklenmesi bu hücreleri oksitlenmiş lipoproteinlerin neden olduğu hücre ölümlerinden korumuştur (20).

Resveratrol hepatoprotektif olarak da oldukça etkilidir. Karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynayan satellit hücrelerin proliferasyonu oksidatif stres ile daha da artar. Ancak resveratrol ve diğer antioksidanların kombinasyonu bu hücrelerin aktivasyonunu inhibe eder. Böylece hepatik fibrogenesis de önlenmiş olur. Kawada ve arkadaşları (41) resveratrolün satellit hücrelerin inhibisyonunu hücre protein dizilimini ve sinyal iletimini bozarak oluşturduğunu bulmuşlardır (20). Ayrıca aynı araştırmacılar resveratrolün nitrik oksit ve tümör nekrosis faktör (TNF α) üretimini de inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak resveratrolün kardiyoprotektif, kemoprotektif, nöroprotektif, hepatoprotektif etkileri olduğu yapılan pek çok çalışmalarda gösterilmiştir. (18,19,20).

2-1-5. Estrojenik aktivite

Trans resveratrol ve sentetik estrojen olan dietilstilbesterol arasındaki yapısal benzerlik resveratrolün estrojenik aktivitesinin de olabileceğini akla getirmiştir (14).



Şekil 3. Resveratrol ve dietilstilbesterol (54)

Resveratrol bir fitoestrojendir. Fitoestrogenler genel olarak memelilerde estrogenik hareketi başlatan maddeler olarak tarif edilirler. Bir memeli estrogeni olan β -estradiole benzerler. Bunların estrogenik aktivitesi azdır. Fitoestrogenler estrogen agonisti ve/veya antagonisti olarak biyolojik aktivite gösterirler (60).

Fitoestrogenler aynı zamanda selektif estrogen reseptör modülatörü (SERM) olarak sınıflandırılmışlardır. SERM'ler E2 (estradiol) benzer yapıda nonsteroid kimyasallardır. Estrogen reseptörlerine affinite gösterirler. Bunlar dokudaki estrogen reseptörlerine ve dolaşımdaki estrojene uyumlu olarak agonist ve antagonist aktivite göstermektedir. Tamoksifen, raloksifen ve faslodeks bu gruptadır. Tamoksifen meme kanserinde kullanılır. Çünkü meme dokusunda estrogen antagonisti olarak hareket eder. Kemik dokusu ve kardiyovasküler sistemde estrogen agonisti gibi hareket eder (60).

Fitoestrogenler iki tip reseptöre bağlanırlar. Bunlar $ER\alpha$ ve $ER\beta$ olarak bilinir. $ER\alpha$ ve $ER\beta$ doku dağılımı bakımından farklılık gösterir. $ER\alpha$ uterus, yumurtalık ve böbrekte fazlayken, $ER\beta$ 'nin uterus, yumurtalık, testis, kemik, akciğer ve beyinde daha çok görüldüğü saptanmıştır. $ER\alpha$ ile karşılaştırıldığında fitoestrogenlerin affinitesi, $ER\beta$ ya daha fazladır (60).

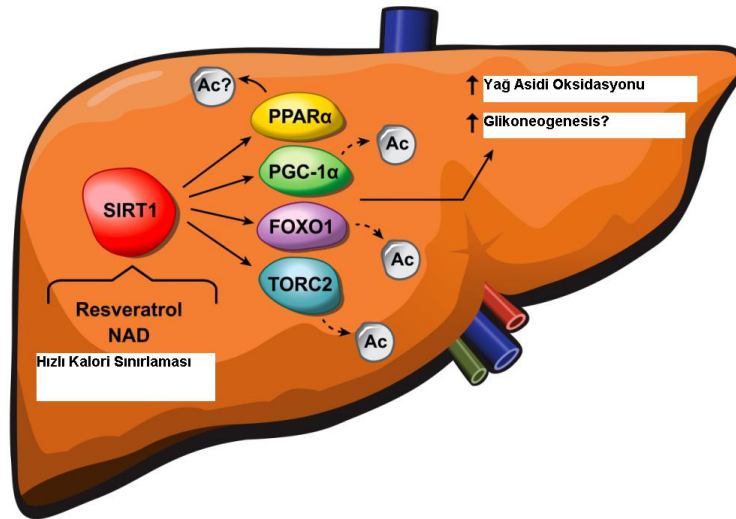
Bununla birlikte resveratrolün bir estrogen agonisti mi veya antagonisti mi olduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır (14). Bazı çalışmalar resveratrolün estrogenik aktivitesinin olduğu yönüyle (24,80), bazıları da antiestrogenik aktivitesi olduğunu

savunur (6,48). Gehm ve arkadaşları (24), estrogen (+) veya estrogen (-) meme adenokarsinoma hücrelerinde resveratrolün biyolojik etkilerini göstermesi için gerekene yakın dozlarda kullanıldığında (3-10 $\mu\text{mol/L}$), estrogen reseptörüne bağlanmak için estradiol ile yarıştığını göstermiştir. Bu çalışmada resveratrol estrogen bağımlı meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırmıştır. Jang (36) ve arkadaşları ise buna zıt sonuçlar bulmuş ancak Gehm ve arkadaşları bu sonuçlardaki farklılığın Jang ve arkadaşlarının farklı tipte kanser hücre dizileri kullanmasına bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Jang ve arkadaşlarının kullandığı meme kanser hücreleridir ve bu da estrojene duyarsızdır. Ama aynı tip estrogen (+) insan meme kanser hücresi (MCF 7) kullanıldığında daha yüksek konsantrasyonlardaki resveratrol (20-160 $\mu\text{mol/L}$) hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (53). MCF 7 hücrelerinde resveratrolün bir süperagonist gibi hareket ettiği bulunmuş, oysa diğer hücrelerde eşit veya doğal estrogenlerden daha az aktivasyon gösterdiği tespit edilmiştir. T47D hücreleri gibi değişik estrogen bağlayan meme hücrelerinde fitoaleksinlerin büyümeyi artırdığı saptanmıştır (24). 1999 da yapılan bir in vivo çalışmada resveratrol tedavisinin estrogenik aktivite beklenen parametrelerde etkili olmadığı yayınlanmıştır (80). Yine MCF 7 hücreleri ile sonradan yapılan in vitro çalışmalarda resveratrolün bu hücrelerde büyümeyi engelleyici etkileri olduğu ve 17 β estradiol ün hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalardan çıkarılan sonuç resveratrolün tek başına verildiğinde bir estrogen agonisti gibi davranabildiği ancak estrogen hakimiyetinin olduğu yerlerde antagonist olarak rol aldığı yönündedir (14).

Resveratrolün doz bağımlı etkilerini Basly ve arkadaşları (4) değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar, resveratrolün 10 μM ve 25 μM dozlarında MCF 7 hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve bu konsantrasyonlarda MCF 7 hücrelerinde büyümede artış saptamışlardır. Halbuki resveratrolün 1 μM konsantrasyonunda bir etki olmamış, 50 μM konsantrasyonunda ise hücre büyümesinde azalma ve sitotoksik etkiler saptanmıştır. Bu bulgular dozun kritik bir önemi olduğunu destekler (14).

2-1-6. Resveratrol ve yaşlanma önleyici etkileri

David Sinclair ve araştırma grubu (72) resveratrol etkilerini çalışmışlar ve resveratrolün nikotin amid adenin dinükleotid bağımlı deasetilaz sınıfından bir sirtülin olan SIR2 enzimini artırarak ömrü uzattığını bulmuşlardır. (68) Bu artış kalori kısıtlamasının yaşam süresini uzatmasındaki artış gibidir (28). Yine 2006 da Sinclair ve grubu farelerin sağlığı ve hayatta kalması üzerinde resveratrolün etkileri ile ilgili yeni ufuklar açan bir araştırma yayınlamışlardır (8,68). Çalışmada fareler standart diyet ve yüksek kalorili diyetle resveratrol eklenerek ve eklenmeyerek beslenmişlerdir. Her iki yüksek kalorili diyet alan grup da kilo almış, ancak resveratrol eklenmiş olan gruptaki sıçanların insüline duyarlılığı artmış, karaciğerde daha az yağ depolanması gelişmiş, her bir hücrede mitokondri miktarı artmış ve motor fonksiyonlarında düzelme saptanmıştır. Farelerde, insanlarda olduğu gibi SIRT1 enzimi (SIR 2 yüksek memeli analogu) resveratrol ile up-regüle olur. SIRT 1 belirli molekülleri deasetile eden NAD ye bağımlı bir enzimdir. Deasetile ettiği moleküller arasında peroksizom proliferatör ve aktivatörü reseptör gamma co-aktivatör 1 alfa (PCG-1- α), forkhead box O (FOX-01) ve endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) bulunur. SIRT 1 karaciğerde yağ metabolizmasını, glukoneogenez ve glikolizi regüle eder. Vasküler sağlığı ve hücre sürekliliğini sağlar (68).



Şekil 4. SIRT-1 karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu ve glukoneogenezini regüle eder (67)

Resveratrolün yaşlanma önleyici etkisinde mümkün görülen diğer bir mekanizma ise 5'AMP aktive eden protein kinaz (AMPK)'nın induksiyonu olabilir. AMPK karaciğerde yağ metabolizmasında önemli bir enzimdir. Yağ asidi oksidasyonunu artırır, HMG-CoA redüktaz aktivitesini down regüle eder, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı olarak rol alır (68).

2-1-7. Resveratrolün antiinflamatuvar etkisi

Resveratrol antiinflamatuvar aktivitesini nükleer faktör kappa B (NF-κB)'nin aktivasyonunun inhibisyonuna aracılık ederek gerçekleştirir. Resveratrol NF-κB'yi inhibe eder ve böylece inflamatuvar sitokin salıverilmesi inhibe olur. Adipositlerin tümör nekrozis faktör alfa (TNFα) tedavisi NF-κB aktivasyonunun artmasını tetikler, interlokin 6 (IL-6) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) salıverilmesini artırır. Resveratrol ve diyetle alınan polifenoller NF-κB aktivasyonunu, IL-6, COX-2 salıverilmesini inhibe eder (25). Pearson ve arkadaşları (63) farelerde resveratrol tedavisinin TNFα, IL-6, IL-1β, intersellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1)in salıverilmesini ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) salıverilmesini azalttığını bulmuşlardır. Farklı bir çalışmada ise kronik kolit oluşturulmuş farelerde resveratrolün, TNFα, IL-1β, COX-2, iNOS aktivitesini azalttığı ve anti inflamatuvar immün regülatör sitokini ve IL-10 u artırdığı bulunmuştur (69).

2-1-8. Resveratrolün farmakokinetiği

Walle ve arkadaşları (84) ¹⁴C ile işaretli resveratrolü oral (25 mg) veya İV (0,2mg) dozunda sağlıklı deneklere vermişlerdir. Total radyoaktivite ölçümleri resveratrolün oral emiliminin yüksek (en az %70) olduğunu göstermiştir. Radyoaktivitenin büyük kısmı idrarda tespit edilmiştir (53,4-84,9%). Fakat feçesten atılımda oral alım (0,3-38,1%) ve İV (0,6-22,7%) verilişte yüksek oranda varyasyonlar izlenmiştir. Bu sonuçlar enterohepatik siklus varlığını destekler yöndedir.

Resveratrol maksimum plazma konsantrasyonuna oral alımdan 1 saat sonra ulaşmış, ikinci pik 6 saat sonra meydana gelmiştir. Muhtemelen bu intestinal hidrolizden sonra reabsorbe olan konjuge metabolitlerin enterik resirkülasyonunun sonucudur. İV dozdan sonra ikinci pik olmamıştır. İV bolustan sonra resveratrol tüm

vücuda dağılmıştır. Ve muhtemelen karaciğere ulaşmadan ve enterohepatik sıklüse girmeden önce doku ve proteinler tarafından bağlanır. Oral alımdan sonra resveratrol ve onun metabolitleri karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğramıştır. Yine aynı çalışmada resveratrolün beş majör metaboliti saptanmıştır. Bunlar iki izomerik resveratrol mono glukronidi, bir resveratrol monosülfat, bir dihidroresveratrol monoglukronid ve bir dihidroresveratrol sülfatdır.

Resveratrolün iv verilişinde, plazma radyoaktivitesinde 1 saat kadar bir sürede hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Bununla birlikte plazma total radyoaktivitesinin yarılanma ömrü hem iv verilişte hem de oral alımda 10 saat olarak kaydedilmiştir. Ve verilişten sonra geçen süreye paralel olarak plazma konsantrasyonu da azalmıştır (12,84).

Son yıllarda yapılan farklı bir faz I çalışmada doz yükseltilecek resveratrolün farmakokinetiği ve güvenliği sağlıklı deneklerde incelenmiştir. Bu çalışmada resveratrolün ve metabolitlerinin plazma ve idrar konsantrasyonları UV ile işaretli yüksek performans likit kromatografi (HPLC) ile belirlenmiştir. Dışkı örnekleri analiz için toplanmıştır. Bu çalışmada Boocock ve arkadaşları (7) resveratrolü tek doz olarak 0,5-5g aralığındaki dozlarda deneklere vermişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre serbest resveratrol nispeten düşük sayılabilecek plazma konsantrasyonunda (0,5g için 75 ng/ml, 5g için 539ng/ml) hızlı absorbe edilmiştir (0,83-1,5 saat aralığında). Resveratrolün majör metabolitleri 3-O-sülfat ve monoglukroniddir. Yarılanma ömrü 2,9 ile 11,5 saat arasında bulunmuştur. Bu çalışmada resveratrolün tüm vücut klerensi 2235-4930L/h, ortalama dağılım hacmi 9128-22226 L olarak bulunmuştur ki bu da düşük biyoyararlanım ve lipofilik özellik ile uyumludur. Bu çalışmaya göre resveratrol idrar ve dışkı yolu ile vücuttan atılır. Dışkıda resveratrolün metabolitlerinin de izlenmesi enterohepatik resirkülasyon olduğunun kanıtıdır (7,12).

2-1-9.Toksisite

Crowell ve arkadaşlarının (13) yaptıkları bir çalışmada trans-resveratrol 0,3-1 ve 3 g/kg/gün dozunda oral gavaj yolu ile 4 hafta süre ile verilmiş, 40 sıçandan sadece iki tanesi yüksek doz nedeni ile ölmüştür. Resveratrol ile nefrotoksisite ve yüksek doz nedeni ile çokça advers etki meydana gelmiştir. 0,3g/kg/gün dozunda karaciğerde histolojik açıdan bir değişikliğe rastlanmamıştır. Ancak daha önce yapılan bir çalışmada

20mg/kg/gün dozunda 4 hafta süre ile yapılan resveratrol tedavisinde serum karaciğer aspartat aminotransferaz enzim seviyelerinde artış ayrıca beyin ve testis ağırlığında da artış saptanmıştır (12,40). Araştırmacılar resveratrolün iyi tolere edildiği ve toksik olmadığı ve dişi ve erkek sıçanlarda embriyofatal etkilerinin olmadığı düşüncesinde hemfikirdirler.

İnsanlarda Vas de Silva ve arkadaşlarının yaptığı araştırmaya göre (81) resveratrolün 400 mg ı 24 denekten 3 ünde kan elektrolit düzeylerinde değişime, nazofarenjite ve ciltte eritem tarzı döküntülere neden olmuştur. En sık rastlanan yan etkiler: Frontal baş ağrısı, alt ekstremitelerde miyalji, somnolans, epididimit, baş dönmesi ve oksipital baş ağrısıdır. Ancak bu etkilerin hangi dozlarda meydana geldiği açıklığa kavuşmamıştır (12).

2-2.Estrojen

Doğal estrogenler, estron, estradiol ve estriol dür. Bu bileşikler 18 karbonlu yapıya sahiptirler. Bunlardan estradiol vücutta en fazla bulunan ve estrogenik etkileri en fazla olan doğal estrojendir. Estradiol vücutta kısmen estrona dönüşür. Estrojenlerin büyük kısmı overlerde Graaf folikülünde sentez edilirler. Sentez yeri folikülün granuloza hücreleridir. Overlerde yapılan estrogen sentezinde estrogenlerin prekürsörleri teka hücrelerinde yapıp granuloza hücrelerine sunulan androjenik maddelerdir. Androstenedion overlerde estrona ve daha az olarak da testosterona dönüşür. Testosteron ise demetilasyon ve aromatizasyon sonucu estradiol ‘a çevrilir (42).

Estrojen sentezi:

- ✓ Plasentada
- ✓ Adrenal kortekste
- ✓ Testislerde
- ✓ Yağ dokusu, karaciğer, böbrek, akciğer, cilt, beyin ve çizgili kaslarda yapılmaktadır.

Androstenedion’dan estron veya testosterondan estradiol oluşumu aromataz enzimi tarafından kataliz edilir. Aromataz enzimi over ve plasenta dışında, implante olmamış blastokistte, kadınlarda yağ dokusunun stroma hücrelerinde, erkeklerde leydig

ve stroma hücrelerinde ve her iki cinste de karaciğer, cilt, çizgili kaslar ve beyinde bulunur. Overlerde estradiol ve progesteron salgılanması ön hipofizden periyodik olarak salgılanan gonadotropinler (FSH, LH) tarafından düzenlenir.

Postmenopozal kadınlarda ve premenopozal dönemde bilateral ooferektomi yapılanlarda, estrogenlerin hipotalamohipofizer eksen üzerindeki baskısı ortadan kalkınca GnRH, LH ve FSH aşırı derecede salgılanır. Bu dönemde estrogenlerle hormon yerine koyma tedavisine başlandığında LH düzeyi iner (42).

2-2-1.Estrojen reseptörleri

Estrojenler etkilerini estrogen reseptör alfa(ER α) ve estrogen reseptör beta(ER β) aracılığı ile gösterirler. Bu reseptörler nükleer reseptör süperfamilyasındadırlar. Yüksek oranda estrogen reseptörü taşıyan hedef organlar meme dokusu, overler ve uterus olarak bilinir. Kemik, kardiyovasküler sistem, beyin, immün sistem ve karaciğer düşük ER içermesi ile bilinirler. Estrojenler etkilerini bu dokularda bulunan ER'lerini direkt veya indirekt olarak aktive ederek oluştururlar. Endojen estrogenler, sentetik estrogen analogları veya fitoestrogenler hücrelere girerek estrogen reseptörlerine bağlanırlar (62). Fitoestrogenler ER β ya daha fazla affinite gösterirler. Estrojen ilaç molekülü ile bağlanmış reseptör estrogenik etkiye aracılık eden özgül genlerin düzenleyici bölgesindeki estrogen cevap elementi denilen DNA segmentine bağlanırlar. Ve o gendeki transkripsiyon olayını hızlandırır. Bazen de yavaşlatırlar. Oluşan mRNA ve onun ribozomlarda sentez ettirdiği proteinler estrogenlerin fizyolojik ve farmakolojik etkilerini oluşturur (42).

2-2-2. Fizyolojik etkiler

✓ Pubertede uterus, vajina, fallop tüplerinin ve memenin büyümesinden estrogen sorumludur (47). Marjoke ve arkadaşları etinilestradiol (EE2) ve zearalenone (ZEA) un immatür sıçanlardaki etkisini incelemişler ve EE2 nin ZEA'ya göre daha güçlü ve daha potent olduğunu, EE2 nin uterus ağırlığını ZEA ya göre daha fazla artırdığını bulmuşlardır (51) .

✓ Cilt altı yağ dokusunun dağılımının düzenlenmesi de estrogen etkisi altında gerçekleşir (42).

✓ Estrojenler ayrıca sekonder seks karakterlerinin gelişmesi ve menstrüel siklünün endokrin açıdan kontrolünde de majör rol oynarlar.

✓ Puberte sırasında kızlarda büyümenin birdenbire artmasından da estrojen sorumludur. Bu etkide büyüme hormonu ile birlikte hareket ederler. Özellikle uzun kemiklerin ve epifizyel kapanma hattının büyümesinden sorumludurlar (47).

✓ Aksiller ve pubik kıllanma, genital bölgede pigmentasyon artışı, meme başı ve vulvada bölgesel pigmentasyon artışı ve gebelikte yüzde oluşan pigmentasyon estrojen etkisi ile olmaktadır (47) .

✓ Estrojenik bileşiklerin multipl iskelet koruyucu etkileri in vitro (43,76) ve in vivo (10) olarak gösterilmiştir. Somjen ve arkadaşları insan kemik hücre kültürünün fitoestrogenlere ve estrojen reseptörlerine spesifik etki eden agonist ve antagonistlere cevabını araştırmışlar ve bu bileşiklerin hücrede DNA sentezini ve kreatinin kinazı (CK) artırdığını göstermişlerdir (74).

✓ Estrojenlerle tedavi edilen hastalarda meme ve endometrium kanser sıklığı artmaktadır. Uzun süre estrojen kullananlarda selim hepatik adenoma ve primer karaciğer kanseri insidansında artma olur (42)

✓ Estrojen replasman tedavisinin postmenopozal kadınlarda kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bu etkisini indirekt olarak lipoprotein metabolizmasını etkileyerek direkt olarak ta damar duvarlarına etki ederek yapar. Estrojen reseptörleri damar düz kas hücrelerinde ve damar endotelinde belirlenmişlerdir. Estrojen alımıyla insanda ve deney hayvanlarında damarlarda vazodilatasyon meydana gelmektedir. Bu etkiyi prostasiklin ve nitrik oksit sentezini aktive ederek oluşturur (18) .

2-2-3.Estrojenlerin tedavide kullanım alanları

Estrojenik ilaçlar klinikte endojen estrojenlerin etkisini taklit etmek, overlerin gelişme bozukluklarında ve postmenopozal dönemde eksilmiş olan hormonu yerine koymak amacı ile estrojen-progesteron dengesizliğini düzeltmek amacı ile ve gebeliği önlemek için kullanılmaktadır.

2-2-4.Selektif Estrojen Reseptör Modölatörleri (SERM) ve Antiestrojenler

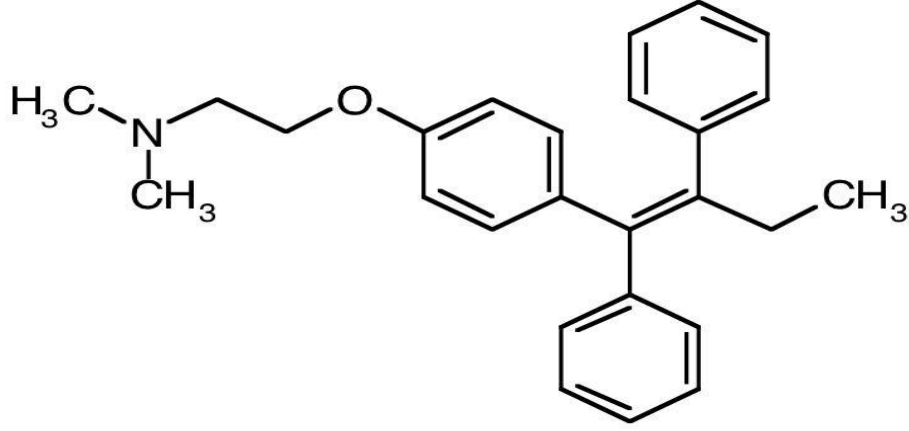
2-2-4-1. SERM

Estrojenler reseptörlerinin bulunduğu dokulara yüksek affinitesi olan ve doz bağımlı etki gösteren bileşiklerdir. Pleiotropik etki gösterirler çünkü over, testis, meme, uterus, kemik, karaciğer, immün sistem, kardiyovasküler ve santral sinir sistemi gibi pek çok dokuda reseptörleri bulunur (62). Estrojenler için hedef hücrelerde en az iki tip reseptörün bulunması(ER α ,ER β) ve işlevlerinin farklı olması doku ve organa selektif estrojen agonist ve antagonistlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (42). Bazı dokularda antagonist özellik gösterip (meme, uterus) bazı dokularda agonist etki gösterebilen (kemik, beyin, kardiyovasküler hücreler) bileşiklere SERM adı verilmektedir (62). Tamoksifen bu özelliklere sahip SERM'lerin birinci kuşak üyesidir. Diğerleri toremifen, raloksifen, droloksifen, idoksifen, levomeloksifendir.

2-2-4-1-1.Tamoksifen:

Hedef hücrelerdeki estrojen reseptörlerini bloke ederek etki gösterir. Antagonizmanın kompetitif değil, reseptör proteininin sentezini inhibe ederek olduğuna inanılır. Agonist etkinliği zayıf da olsa bulunmaktadır. Bu nedenle parsiyel agonist özelliği bulunmaktadır (42).

Tamoksifen meme kanserli postmenopozal ve estrojen defisiti bulunan premenopozal kadınlarda, ovariectomize sıçan modellerinde kemik kaybını inhibe ettiği gösterilen tek estrojen agonist/antagonistidir (44). Başlangıçta insan çalışmalarında tamoksifenin bir antiestrojen gibi premenopozal kadınlarda kemik dansitesini düşürdüğü bulundu. Ancak postmenopozal kadınlarda estrojen benzeri etki yaptığı ve osteoporozu karşı koruyucu etki yaptığı daha sonra yapılan çalışmalarda tespit edildi (66). Tamoksifenin uterus üzerinde estrojen agonisti gibi etkisi bulunmaktadır. Bu etkisi nedeniyle endometrium kanseri yapma riski (45,59) ve yapılan çalışmalarda sıçanlarda hepatokarsinogenik (26) etkilerinin bulunması postmenopozal kadınlarda osteoporozu karşı koruyucu amaçlı uzun süre kullanımını kısıtlamaktadır (26,44,45).

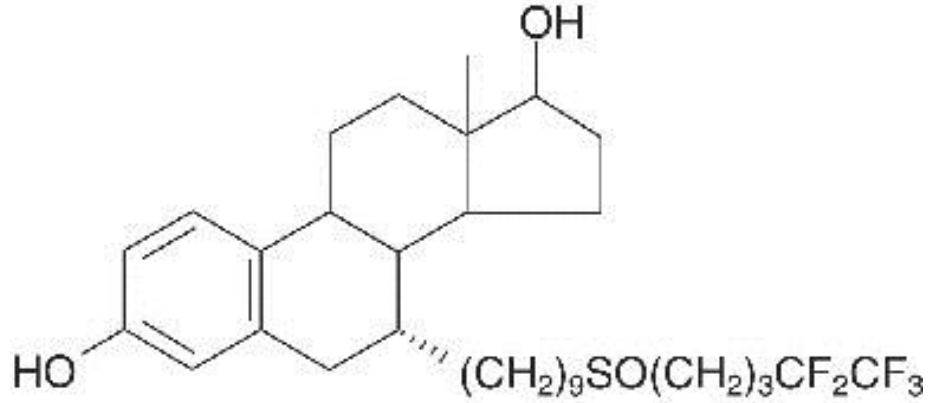


Şekil 5. Tamoksifen (30)

Tamoksifen lipofilik bir ön ilaçtır. Değişime uğramadan kolayca safra kesesi tarafından atılır. %98 Oranında plazma albumine bağlanır. Karaciğerde metabolize olur. Karaciğerde daha az aktif olan N-desmetiltamoksifen ve daha fazla aktif iki form olan 4-hidroksitamoksifen ve endoksifene dönüşür. Hidroksile olan metabolitleri karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğrar. Bu bileşikler entero-hepatik dolaşım aracılığı ile kan dolaşımına girer ve hedef hücrelerine ulaşırlar (59). Yapılan hayvan çalışmalarında tamoksifenin dışkı yolu ile atıldığı belirlenmiştir (38). 4-Hidroksitamoksifen ve endoksifen ER'lerine estrogen ile aynı affiniteyi gösterir. Diğer metabolitlerinin ER'lerine 4-hidroksi grubunda olduğu kadar fazla affinitesi yoktur (59).

2-2-4-1-2. Fulvestrant:

Fulvestrant, 17 beta Estradiolün 7 alfa alkilsülfinil analogudur. Kimyasal yapı bakımından tamoksifen, raloksifen ve diğer SERM'lerden ayrılır (58,82).Fulvestrant ER'lerini kompetitif olarak inhibe eder. %89 oranında estradiole affinitesi vardır.



Şekil 6. Fulvestrant (31)

Fulvestrant –ER bağlanması ile reseptör dimerizasyonu bozulur. Reseptör sitoplazma iletimi bozulur ve böylece reseptörün nükleer lokalizasyonu bloke edilmiş olur. Fulvestrant bir estrogen reseptör antagonistidir. Bu antagonist etkinlik insan ve deney hayvanlarında gösterilmiştir. Fulvestrantın immatür dişi sıçanlardaki etkisi tamoksifene benzemez. Fulvestrantta uterotrofik aktivite yoktur. Fulvestrantın estradiol veya tamoksifen ile birlikte verilmesi estradiol ve tamoksifenin yaptığı maksimal ve parsiyel uterotrofik aktiviteyi bloke eder (58,83). Yeni yapılan çalışmalarda fulvestrantın endometriumda oluşan estradiol bağımlı hacim artışını inhibe ettiği saptanmıştır (17). Yapılan Faz I çalışmada 30 adet postmenopozal dönemde gönüllü kadına 250mg fulvestrant i.m olarak verilmiş ve 14.günde endometriumu bakılmış ve agonist bir aktivite izlenmemiştir. Buna ek olarak plasebo ile karşılaştırıldığında endometrium kalınlığında anlamlı derecede azalma saptanmıştır ($p < 0,0001$). Bu sonuç fulvestrantın estrogen antagonisti olduğunu destekler yöndedir (2).

2-3. Primer Over Yetmezliği (POY)

Primer over yetmezliği over disfonksiyonunun bir alt sınıfıdır. Bu terim amenorenin en az dört ay bir süre ile devam etmesi, seks steroidlerinde azalma, follikül stimüle edici hormonun (FSH) serum konsantrasyonunun 40IU/L den fazla olması ve bunun en az bir ay ara ile iki sefer bu değerlerde ölçülmesi ve bu durumun 40 yaş öncesi dönemde meydana gelmesi olarak açıklanabilir. Pek çok vakada primordial follikül havuzunun erken boşalmasının nedeni açıklığa kavuşmamıştır. Bu durum erken menopoz olarak da isimlendirilebilir.

Etyoloji:

✓ Genetik bozukluklar: X kromozomunun yapısındaki bozukluk ve sayısındaki eksiklik primer over yetmezliğinin sebeplerindedir. Turner sendromunda (45,X), X kromozomunun tamamı veya bir kısmı yoktur. Bir X kromozomu ovaryan değişim için yeterli iken oositler iki aktif X kromozomuna ihtiyaç duyarlar. Böylece fetüste bazı genlerde X kromozomundaki yetersizlik 12 haftadan sonra oosit apoptosisi ile sonuçlanır ve hayatın ilk on yılında oosit kaybı söz konusu olur. Frajl X mutasyonu taşıyıcısı olan kadınlarında erken menopoza girdiği ve bunun sebebinin primer over yetmezliği olduğu bilinir (16).

✓ Kemoterapi: Kemoterapiye bağlı gelişen POY de folliküler matürasyonda veya primordial folliküllerde ya da her ikisinde birden hasar görülür. Siklofosamid, ifosamid, clormetin, busulfan, prokarbazin, klorambusil gibi sitotoksik ilaçlar gonadal hasar yapan ilaçlar arasında sayılabilir.

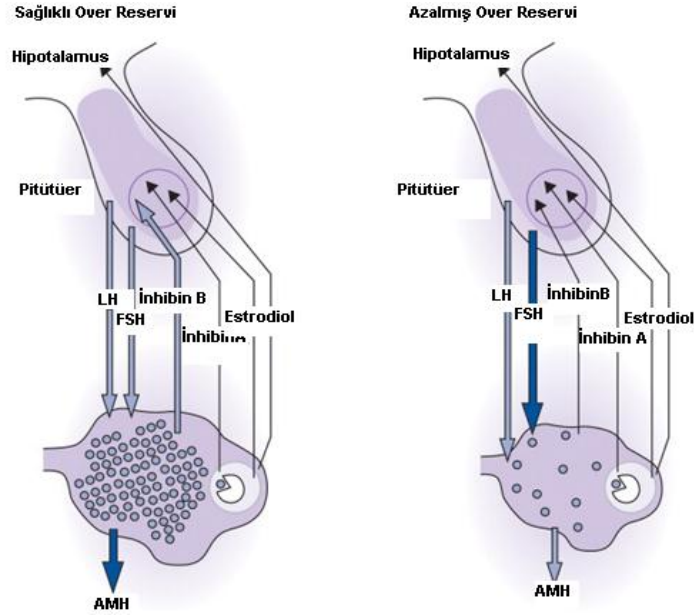
✓ Radyoterapi: Oositler radyasyona duyarlıdır. Özellikle pelvik ve abdominal bölgeye yapılan radyasyon tedavisinde risk oldukça yüksektir.

✓ Cerrahi müdahale: POY overlere yapılan cerrahi müdahale sonrasında da görülebilir.

✓ Otoimmün durumlar: POY ile Diabetes mellitus, Romatoid artrit, Myastenia gravis, Sistemik lupus eritematosus gibi otoimmün hastalıklar birlikte görülürler. Ayrıca antiover antikorların varlığı POY ile otoimmünite arasında bağlantı olabileceğini akla getirir.

Ancak yaklaşık %90 oranında herhangi bir neden olmaksızın bu durum oluşmaktadır ki bu da idiyopatik olarak adlandırılır (16) . POY' lu kadınların serumlarında yüksek seviyede FSH ve LH, düşük seviyede estrojen ve inhibin görülür.

Ovaryan yetmezlik overlerde estrojen ve progesteron yokluğu ile sonuçlanır. Gonadal steroidler kadının üretim işlevlerini sağlıklı sürdürmesi için oldukça önemlidir. Aynı zamanda steroidlerin yokluğu kemik, kardiyovasküler sistem, ruh sağlığı ve cinsel işlevlerin sağlıklı sürdürülmesi açısından da oldukça önemlidir (16).



Şekil 7. Artan yaşla birlikte sağlıklı ve azalmış ovaryan rezerv ve ovaryan ve hipotalamopitüteri hormon konsantrasyon değişimleri (16).

AMH=Antimülleriyan hormon FSH=Folikül stimüle edici hormon LH=Lüteinize edici hormon

2-4. Vinilsiklohekzen diepoksit (VCD)

Vinilsiklohekzen diepoksit (VCD) in kimyasal formülü $C_8H_{12}O_2$ dir. Molekül ağırlığı 140,20 mg dir. Çeşitli lastik, plastik, kauçuk ve böcek ilacı yapımında üretilen 1,3-bütadian dimerizasyon formuna 4-vinylcyclohexene (VCH) adı verilmektedir. VCD, VCH nin metabolitidir. Sigara ve kömür dumanında bulunur. VCH ve VCD kanser yapıcı etkisi olan çevresel kimyasallardır (29). VCD sıçan ve farelerin oositlerinde primordial ve primer folliküllerde hasar oluşturan tek kimyasaldır (34). Ancak bu etkisini direkt veya indirekt yolla oositlerde granuloza hücrelerini etkileyerek yapıp yapmadığı tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. İnsanların VCD ye maruz kalmaları halinde ovaryan fonksiyonlarının nasıl etkileneceği tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Çünkü bu konuda yeterli miktarda epidemiyolojik çalışma yoktur (34). Ancak endüstriyel işlerde çalışan ve bu kimyasallara maruz kalan insanlar nazal irritasyon, baş ağrısı ve cilt irritasyonundan şikayet etmişlerdir. Bununla birlikte hayvanlarda VCD ve VCH, inhalasyon, dermal ve oral alımda ovotoksositeye neden olurlar (34). VCH farelerde folikül hasarına neden olurken VCD nin fare ve sıçanların her ikisinde de bu etkiyi meydana getirdiği gözlenmiştir (29). VCD nin meydana getirdiği bu ovotoksitenin hipotalamus- hipofiz aksı ile ilgili olup olmadığı

araştırılmış, sonuç olarak VCD nin bu aksa bağlı etkiler göstermediği, VCD nin direkt olarak overlere toksik olduğu saptanmıştır (29). VCD nin overlerde meydana getirdiği follikül kaybına apoptosis ve folliküllerde doğal atreziye gidişin hızlanması yolu ile etki ettiği düşünülmektedir (78). Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. VCD preantral folliküllerde meydana getirdiği hücre ölümünü moleküler düzeyde çeşitli sistemleri etkileyerek gerçekleştirir.

Bu sistemler:

1-Mitokondriyal Bax/Blc_{x1} oranını artırma:

Hücrede apoptoz için belirli etmenlerin olması gerekir. Bunlardan biri de proto-onkojen olarak bilinen Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 ve onun homoloğu olan Bcl_{x1} hücre ölümüne karşı hücreyi korur. Ancak Bad ve Bax hücre ölümü için gereken sinyalleri aktive eder. Bu sinyallerle mitokondriyal membranda Bax aktivitesi artar ve sitoplazma içine mitokondriyal sitokrom c sızıntısı gerçekleşir. Ve böylece apoptozom aktive olur. En sonunda da kaspaz 3 ve protezlar aktive olurlar (29).

2-Mitokondrilerden sitokrom-c sızıntısını artırma:

Yapılan çalışmalarda VCD nin mitokondrilerden sitokrom c sızıntısını artırdığı gözlemlenmiştir (35).

3-Kaspaz 3 aktivitesinin artması:

VCD verildiğinde moleküler düzeyde kaspaz 3 aktivitesinin primer ve primordial folliküllerde arttığı görülmüştür. Bu artışın VCD ye verilen ilk cevap olduğu düşünülür (35).

4-Jun kinaz yolağının aktivasyonu olarak sayılabilir. Pek çok hücrede hücre ölümü bu yollarla gerçekleşir (52).

VCD nin preantral folliküllerde yetmezlik meydana getirebilmesi için tekrarlayan dozlarda verilmesi gereklidir (78). Shiao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (71) 28 günlük dişi Fisher 344 cinsi sıçan ve B6C3F1 cinsi farelere, günlük doz 80mg/kg olacak şekilde 6-8-10-12 gün süre ile VCD ip olarak uygulanmış, son dozdan sonra

overler sağlıklı ve atretik overlerin tespiti için alınarak histolojik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 8 gün süre ile VCD tedavisi yapılmış farelerde son dozdan 4 saat sonra primordial folliküllerde atretik görünümlerde artış saptanmıştır. Primer ve primordial follikül kayıpları sıçan ve farelerde ilk olarak 12. günde tespit edilmiştir. Sıçanlarda 10. güne kadar atretik folliküllerde herhangi bir artış izlenmemiştir. VCD uygulanan farelerde FSH VE LH da artış, progesteron ve androstenedion da azalma izlenmektedir. 17 beta Estradiol n aktivitesi çok düşüktür (1).

Tüm bu bilgilerden yola çıkararak bu çalışmada estrojenik aktivitesi tartışmalı olan resveratrolün immatür dişi sıçanlarda ve VCD ile over yetmezliği geliştirilen puberte dönemindeki dişi sıçanlarda, yüksek dozlarda (2-20mg/kg) oluşturacağı estrojene bağlı değişen uterus büyümesi ve farklılaşması, over farklılaşması, vücut ağırlığı, kemik dansitesi ve kemik gelişimi ile ilgili kan değerlerinde yaptığı doz bağımlı etkilerini incelemeyi amaçladık.

3-GEREÇ VE YÖNTEM

3-1. Hayvanlar

Deneylerde 21 günlük 20-40 gr ağırlığında immatür ve 28 günlük 40-50 gr ağırlığında puberte öncesi Sprague-Dawley dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM) tarafından sağlandı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon şeffaf kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde, 20±2°C sıcaklıkta, iyi havalandırılan odalarda barındırıldı. Standart hayvan yemi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen bütün deneyler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komisyonu'ndan 19-10- 2010 tarih 175 nolu onay alındıktan sonra yapıldı.

3-2. Deneylerde kullanılan kimyasal farmakolojik maddeler ve dozları

Resveratrol	Sigma
4-Vinilsiklohekzen Dieposid	Fluka
Fulvestrant	Sigma
Tamoksifen	Sigma
17alfa Etinil estradiol	Sigma
17 beta estradiol	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Eter	
Distile su	

3-3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

ELISA Okuyucu	ThermoLab
---------------	-----------

Vorteks	IsoLab
Otomatik Pipetler	IsoLab
Hassas Terazi	Kern EW
Santrifüj	Nüve NF800R
Mikroskop	OLYMPUS U-PM-TVC
Fotoğraf Makinesi	OLYMPUS Q COLOR 3
Buzdolabı	Sanyo
Etüv	Nüve
Kemik dansitometre	Norland XR-46

3-4.Deneylerde Kullanılan Kitler

Estradiol EİA Kit	Cayman Kimyasal Şirketi
25 Hidroksi vitamin D EİA Kit	Kaan Medikal

3-5.Deney Protokolü

Sıçanlar iki grupta incelendi:

1-İmmatür (21 günlük) dişi sıçan çalışması

2- Puberte dönemindeki (28 günlük) sıçanların overlerinde 4-Vinilsiklohekzen Diepoksit (VCD) ile primordial ve primer follikül hasarı geliştirilmiş sıçan çalışması.

3-5-1.İmmatür dişi sıçan çalışması

Bu çalışmada 21 günlük 20-40 gr ağırlığında 60 adet dişi sıçan kullanıldı. Deneyde resveratrolün immatür sıçanlarda oluşturduğu estrojenik etkilerini incelemek üzere sıçanlar her grupta 6 adet sıçan olmak üzere 10 gruba ayrıldı.

Gruplar: n=6

Grup 1 (K); 1/5 oranında oral gavaj yolu ile DMSO + Distile su ile hazırlanmış çözücü (0,1ml) verilen sıçanlar.

Grup 2 (17alfaEE); 30 µg/kg/gün dozunda oral gavaj yolu ile 0,1ml hacim içinde 17alfa Etinil Estradiol tedavisi verilen sıçanlar.

Grup 3-4-5 (RES2-RES10-RES20); 2-20 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yolu ile 0,1ml hacim içinde resveratrol tedavisi verilen sıçanlar.

Grup 6 (RES2+17alfaEE); Oral gavaj yolu ile 0,2ml hacim içinde resveratrol 2 mg/kg+ 17alfa Etinil Estradiol 30 µg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar.

Grup 7 (RES 10+TMX); Oral gavaj yolu ile 0,2ml hacim içinde resveratrol 10mg/kg/gün+Tamoksifen 2µg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar

Grup 8 (RES 10+FLV); Oral gavaj yolu ile 0,2ml hacim içinde Resveratrol 10mg/kg/gün +Fulvestrant 5 mg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar

Grup 9 (17alfaEE+TMX); Oral gavaj yolu ile 0,2ml hacim içinde 17alfa Etinil Estradiol 30 µg/kg/gün +Tamoksifen 2µg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar

Grup 10 (17alfaEE +FLV); Oral gavaj yolu ile 0,2ml hacim içinde 17alfa Etinil Estradiol 30 µg/kg/gün +Fulvestrant 5 mg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar olarak belirlendi.

(Fulvestrant ve tamoksifen ile birlikte Resveratrol tedavisi uygulanan gruplarda Resveratrolün etki görülen en düşük dozunun kullanılmasına karar verildi.)

Sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra daha önce belirlenen dozlarda 3 gün süre ile oral gavaj yolu ile tedavi (DMSO/su, estradiol veya resveratrol) verildi. Son dozdan 24 saat sonra sıçanların vücut ağırlıkları tekrar ölçülerek kaydedildi. Sıçanlar eter anestezisi altında uyutuldu. Sıçanlardan kardiyak puncture yolu ile 1ml kadar kan alındıktan sonra hayatlarına aşırı doz anestezisi ile son verildi. Sıçanlara batin diseksiyonu yapılarak uterusları overler ile birlikte alındı. Overler ayrılarak histolojik değerlendirme yapmak için doku takip plaklarına konuldu. Sıçanların uteruslarının ıslak

ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Alınan uterusun yarısı yine histolojik değerlendirme için doku takip plağına alındı. Diğer yarısı ise yeniden tartılarak ıslak ağırlığı ölçüldükten sonra 60 °C sıcaklıkta 12 saat süre ile etüvde kurutulup tartıldı. Böylece uterus kuru ağırlıklarına da ulaşılmış olundu. Alınan kanlar 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri -40 °C de saklandı.

3-5-2. Puberte dönemindeki (28 günlük) sıçanların overlerinde 4-Vinilsiklohekzen Diepoksit (VCD) ile primordial ve primer follikül hasarı geliştirilmiş sıçan çalışması

Bu çalışmada 28 günlük 40-50 gr ağırlığında 60 adet dişi sıçan kullanıldı. Deneyde resveratrolün puberte döneminde VCD ile primordial ve primer follikül hasarı geliştirilmiş sıçanlarda oluşturduğu estrojenik etkilerini incelemek üzere sıçanlar her grupta 6 adet sıçan olmak üzere 6 gruba ayrıldı.

Gruplar: n=6

Grup 1(K); ip olarak DMSO (0,1 ml) verilen sıçanlar

Grup 2 (VCD); ip olarak 160 mg/kg/gün dozunda 0,07ml VCD tedavisi verilen sıçanlar

Grup 3 (VCD+17alfaEE); ip olarak 160mg/kg/gün VCD (0,07ml) + oral gavaj yolu ile 30 µg/kg/gün 17alfa Etinil Estradiol (0,1ml) tedavisi verilen sıçanlar

Grup 4 (VCD+RES10); ip olarak 160mg/kg/gün VCD (0,07ml) + oral gavaj yolu ile 10mg/kg/gün resveratrol (0,1ml) tedavisi verilen sıçanlar

Grup 5 (VCD+RES10+TMX); ip olarak 160mg/kg/gün VCD (0,07ml) + oral gavaj yolu ile 0,2ml içinde 10mg/kg/gün resveratrol ve Tamoksifen 2µg/kg/gün tedavisi verilen sıçanlar

Grup 6 (VCD+17beta E); ip olarak 160mg/kg/gün VCD (0,07ml) + oral gavaj yolu ile 0,1 ml içinde 0,4mg/kg/gün 17beta Estradiol tedavisi verilen sıçanlar olarak belirlendi.

(Bu çalışmada, resveratrolün immatür dişi sıçan çalışmasında etki görülen en düşük dozunun kullanılmasına karar verildi.)

Sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra DMSO da çözdürülen 160mg/kg/gün dozunda VCD ip olarak 15 gün süre ile verildi (56). Her bir sıçan için ayrı enjektör kullanıldı ve enjeksiyonlar 24 saat ara ile her gün aynı saatte uygulandı. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlara belirlenen tedavi oral gavaj yolu ile 4 gün süre ile uygulandı. Son dozdan 24 saat sonra sıçanların vücut ağırlıkları tekrar ölçülerek kaydedildi. Sıçanlar eter anestezisi altında uyutuldu ve kardiyak puncture yolu ile 1ml kadar kan alındıktan sonra hayatlarına aşırı doz anestezisi ile son verildi. Sıçanlara abdominal kesi yapılarak, uterusları, overler ile birlikte alındı. Overler ayrılarak histolojik değerlendirme yapmak için %10luk formalin içinde tespit edildi. Sıçanların uteruslarının ıslak ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Alınan uterusun yarısı histolojik değerlendirme yapmak için %10luk formalin içinde tespit edildi. Diğer yarısı ise yeniden tartılarak ıslak ağırlığı ölçüldükten sonra 60 °C sıcaklıkta 12 saat süre ile etüvde kurutulup tartıldı. Böylece uterus kuru ağırlıklarına da ulaşılmış oldu. Alınan kanlar 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri -40 °C de saklandı. Ayrıca bu çalışma grubunda her bir hayvanın sağ femuru kemik dansitometresi ölçülmesi için alındı.

3-5-3.Uterus Etkilerinin Morfometrik Değerlendirmesi

Uterus etkilerinin morfometrik olarak değerlendirmesinde;

Uterus Ağırlık Değerlendirmesi=(Uterus Ağırlığı (UA) (mg) / Vücut Ağırlığı
2(VA2) (g)) x 1000

Uterus Kuru Ağırlık Değerlendirmesi=Uterus Kuru Ağırlığı(UKA)(g) / Uterus
Yaş Ağırlığı(UYA)(g)

Vücut Ağırlığı Artış Yüzdesi Değerlendirmesi=((VA2 - VA1) x 100) / VA1
formülleri kullanılarak değerlendirme yapılmıştır.

3-5-4.Uterus ve Overlerin Histolojik Olarak İncelenmesi

Alınan uterus ve overler %10luk formalin içinde tespit edildi. Fiksasyon işlemi için en az 24 saat beklendi, takiben dokular yıkanıp alkol serilerine geçildi.

%70lik etil alkolde 30 dakika

%80lik etil alkolde 30 dakika

%90lık etil alkolde 30 dakika

%96lık etil alkolde 30 dakika

%100lük etil alkolde 10 dakika

bekletildi. Daha sonra şeffaflaştırmak için xylen de tutuldu ve takiben 60°C lik etüvde 3 adet parafin banyosunda 60 ar dakika tutuldu. Parafin bloklara gömülüp soğumaya bırakıldı. Mikrotomla 3 mikronluk kesitler alınıp hematoksilen ve eosin ile boyandı. Kesitler OLYMPUS U-PM-TVC marka ışık mikroskopta incelendi. Histolojik kesitlere ait resimler OLYMPUS Q COLOR 3 fotoğraf makinesi ile çekildi.

Uterus endometriyum epiteli ölçüldü. Endometriyum epitel kalınlığındaki artış, mitotik hücre sayılarının artışı, uterustaki hipertrofi, bazal lamina altında bulunan hücrelerin iç şeklinde olmaları ve koyu bir nükleusa sahip olmaları estrojenik aktivite lehine değerlendirildi. Bunun yanında endometriyum epiteli kalınlığında azalma, epitelyum hücrelerinin küboid yapıda olmaları, bazal lamina altında bulunan hücrelerin ve çekirdeklerinin yuvarlak şekilli olmaları, uterusta atrofik görünüm, verilen maddelerin antagonist özellikli olmaları yönünde değerlendirildi.

Ovaryumdaki folliküller incelendi. Primer ve primordial folliküllerdeki azalma over yetmezliği olarak değerlendirildi. Kontrol grubuna göre primer ve primordial folliküllerdeki artış estrojenik aktivite olarak değerlendirildi.

3-5-5.Kemik Dansitometresi

Kemik Mineral Dansitesi (BMD) ölçümleri için POY geliştirilmiş puberte dönemindeki dişi sıçanların sağ femurları kullanıldı. Bu işlem sıçanların yaşamlarına yüksek doz anestezi altında son verildiği esnada sıçanların sağ femurları alınarak yapıldı. Femoral BMD hayvanlarda DEXA scanner (Norland XR-46, Norland Corp, Fort Atkinson, WI) ile küçük hayvan tarama yazılımı kullanılarak yapıldı. Tarama çözünürlüğü 0,5x0,5 mm ve tarama hızı 60 mm/sn idi.

3-5-6.Serum Estradiol ve Vitamin D Ölçümleri

Estradiol ölçümleri, estradiol EİA Kit olarak bilinen sıçanlara özel bir kit yardımı ile daha önce alınıp -40°C de saklanan serum örnekleri ile ölçüldü.

Vitamin D ölçümleri ise 25 Hidroksi vitamin D EİA Kit yardımı ile sadece POY geliştirilmiş puberte dönemindeki dişi sıçanlardan alınan kan örnekleri ile çalışıldı.

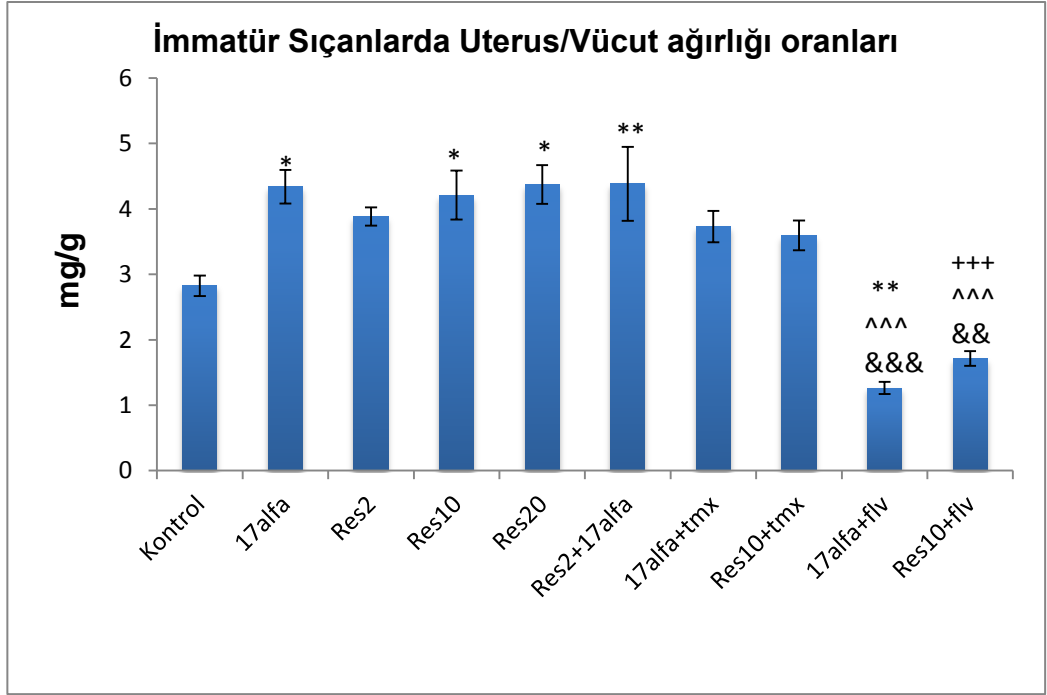
3-6. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistik analizi için eşleştirilmiş veya eşleştirilmemiş Student's testi ve ayrıca gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi, grupların farklılıklarını belirlemek için Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. Verilerin değerlendirmesinde SPSS 15.0 for Windows istatistiksel paket programı kullanılmıştır. 0,05 den küçük t değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4-BULGULAR

4-1.Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları

4-1-1.İmmatür Sıçanlarda Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları



Şekil 8. İmmatür Sıçanlarda Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları (n=6)

(*)Kontrol den farklı, (*)=p<0,05, (**)=p<0,01

(+)Resveratrol (10mg/kg)(RES10) dan farklı, (+++)=p<0,001

(^)17alfa Etinilestradiol (17alfa EE) den farklı, (^^)=p<0,001

(&)Res10+tamoksifen(TMx) den farklı, (&&)=p<0,01, (&&&)=p<0,001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında immatür sıçanlarda uterus yaş ağırlığının vücut ağırlığına oranı:

- ✓ 17 alfa EtinilEstradiol (17alfa EE) verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır(p<0,05).
- ✓ Resveratrol (10mg/kg) (RES10) verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır(p<0,05).
- ✓ Resveratrol (20mg/kg)(RES20) verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır(p<0,05).

RES10 ve RES20 gruplarının ortalama değerleri, 17alfa EE verilen grubun ortalama değerlerine oldukça yakındır. Bu da bu dozlarda resveratrolün estrojenik etkisinin olduğu dūşüncesini doğurur.

- ✓ RES2+17 alfa EE verilen grupta anlamlı derecede artmıştır($p<0,01$).

Ancak RES2 verilen grupla RES2+17 alfa EE verilen grup karşılaştırıldığında anlamlı bir değişme olmadığı görülmüştür. Bu da bu iki maddenin birbirlerinin etkisini değiştirmedeği şekilde yorumlanabilir.

RES10 verilen grupla RES10+TMX verilen grup karşılaştırıldığında TMX in RES10 un ortalama değerlerini düşürdüğü gözlenmektedir. Ancak bu gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilememiştir.

- ✓ 17alfaEE+Fulvestrant (FLV) verilen grupta anlamlı derecede azalmıştır($p<0,01$).

✓ RES10+FLV verilen grupta kontrol grubuna göre ortalama değerlerde düşüş göze çarpmaktadır. Ancak istatistiksel olarak aralarında bir anlamlılık tespit edilememiştir.

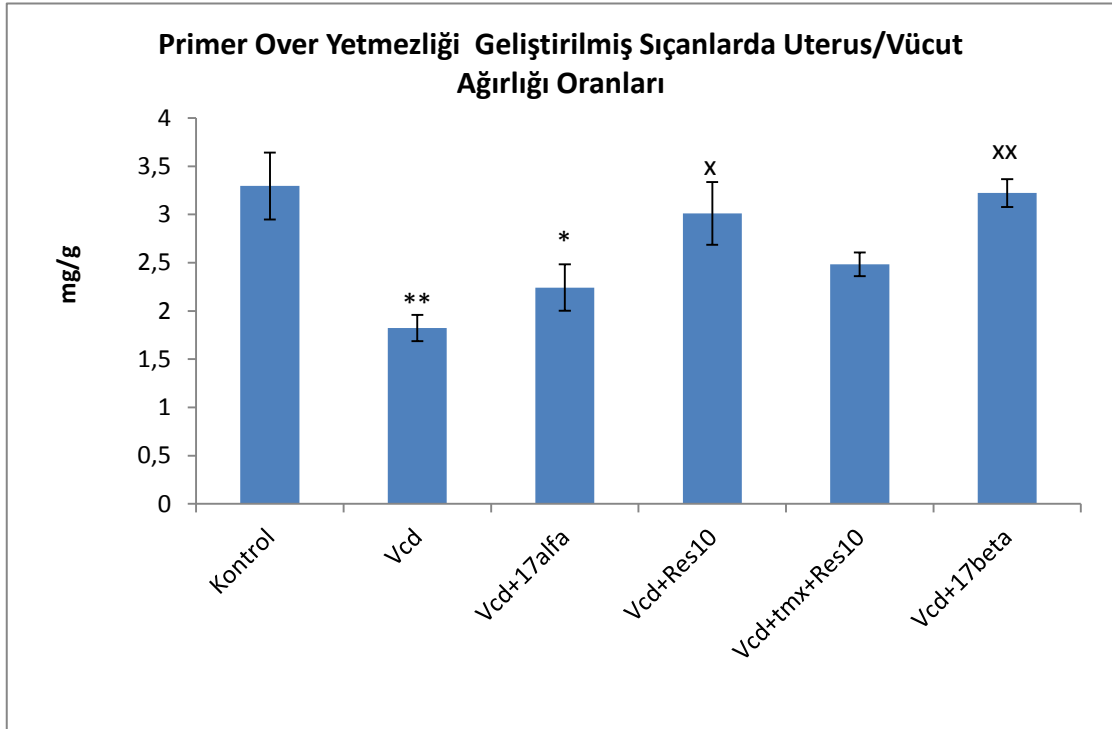
RES10 ile RES10+FLV verilen grup karşılaştırıldığında bir estrojen antagonisti olduğu bilinen fulvestrantın uterus/vücut ağırlığı(UA/VA) oranını anlamlı derecede azalttığı sonucuna ulaşılmaktadır($p<0,001$).

17alfa EE ile 17alfa EE+TMX verilen grup birbiri ile karşılaştırıldığında bu gruplar arasında da istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktur. Ancak bu grupta da RES10+TMX verilen grupta olduğu gibi ortalama UA/VA değerlerinde 17alfa EE 'e göre düşme göze çarpmaktadır. Bu sonuç bize TMX in etkisinin hem 17alfa EE için hem de RES10 için aynı olduğu kanaatine götürmektedir.

17alfa EE verilen grup ile 17alfa EE ve FLV nin birlikte verildiği grupta FLV'in 17alfa EE ün etkisini azalttığı, UA/VA oranını düşürdüğü açıkça belli olmaktadır($p<0,001$). Bu sonuç zaten oldukça doğal bir sonuçtur. Çünkü FLV estrojen antagonistidir.

RES10+TMX verilen grup ile RES10+FLV verilen grup karşılaştırıldığında bir estrogen antagonisti olan FLV'in resveratrolün etkisini anlamlı bir şekilde baskıladığı ($p<0,01$), UA/VA oranını oldukça fazla düşürdüğü gözlenmektedir. Bu FLV'in inhibitör etkisinin TMX den daha fazla olduğu sonucunu doğrular.

4-1-2. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanların Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları



Şekil 9. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Uterus/Vücut Ağırlığı Oranları (n=6)

(*)=Kontrolden farklı (*)= $p<0,05$ (**)= $p<0,01$
(x)=VCD den farklı (x)= $p<0,05$ (xx)= $p<0,01$

Primer over yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda uterus ve vücut ağırlığı oranları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre;

✓ Sadece VCD verilen grupta UA/VA ağırlığında kontrol grubuna göre anlamlı bir düşme saptanmıştır ($p<0,01$).

Bulunan bu sonuca göre VCD nin UA/VA oranında anlamlı bir düşme yarattığı görülmektedir.

✓ VCD+17alfa EE verilen grupta kontrole göre UA/VA oranında anlamlı bir düşme göze çarpmaktadır($p<0,05$).

Bu sonuç,17alfa EE ün VCD ile POY geliştirildikten sonra verilmesinin UA/VA oranında kontrol değerlerine göre bir değişiklik oluşturmadığı şeklinde yorumlanabilir. Oysa 10 mg/kg dozunda verilen resveratrol, VCD nin oluşturduğu UA/VA oranını kontrol değerlerine yakın hale getirmiştir.

VCD+RES10 ile VCD+RES10+TMX verilen grup karşılaştırıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir değişime rastlanmamıştır. Bu Şekil 8 deki sonuca benzerlik göstermektedir.

POY geliştirilmiş sıçanlarda uterus ve vücut ağırlığı oranları karşılaştırıldığında VCD grubuna göre;

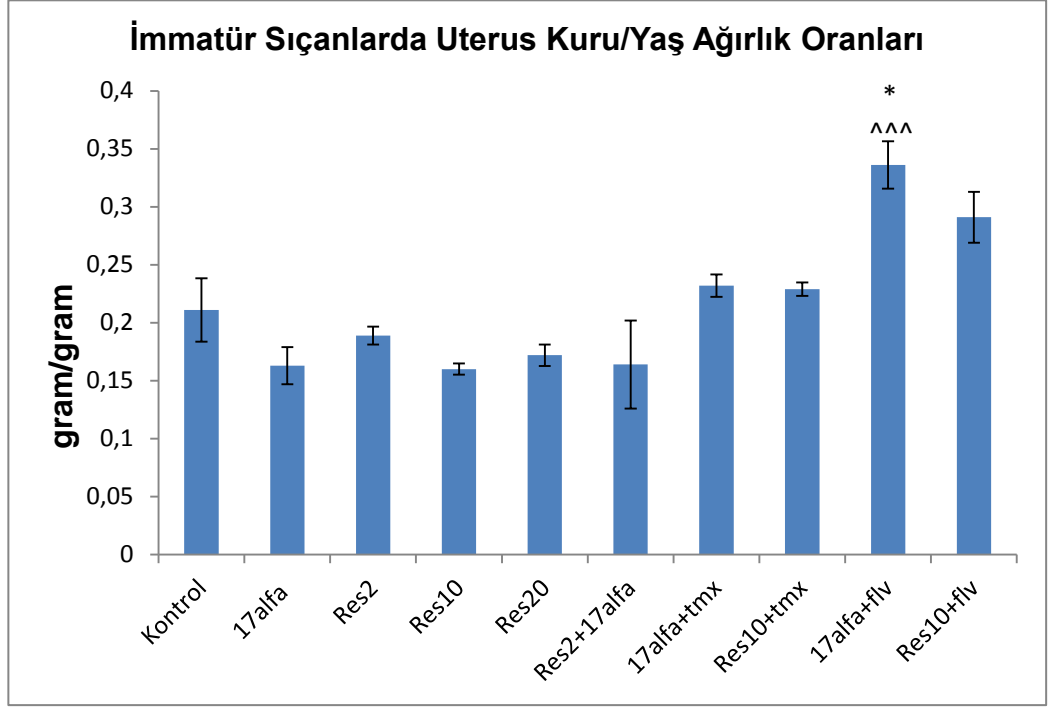
✓ VCD+RES10 verilen grupta UA/VA oranında VCD grubuna göre anlamlı bir artış saptanmıştır($p<0,05$).

✓ VCD+17beta Estradiol (17beta E) verilen grupta da VCD grubuna göre anlamlı bir artış göze çarpmaktadır($p<0,01$).

VCD+RES10 ile VCD+17beta E verilen grupların ortalama değerleri birbirine oldukça yakındır. Buda VCD ile over yetmezliği geliştirilmiş sıçanların uteruslarında resveratrolün, 17 beta Estrodiol gibi etkinlik gösterebildiği ve uterus ağırlığının artmasında 17 beta Estrodiol kadar etkili olabildiği sonucunu doğurabilir.

4-2.Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları

4-2-1.İmmatür Sıçanlarda Uterus Kuru/Yaş (UK/UY) Ağırlık Oranları



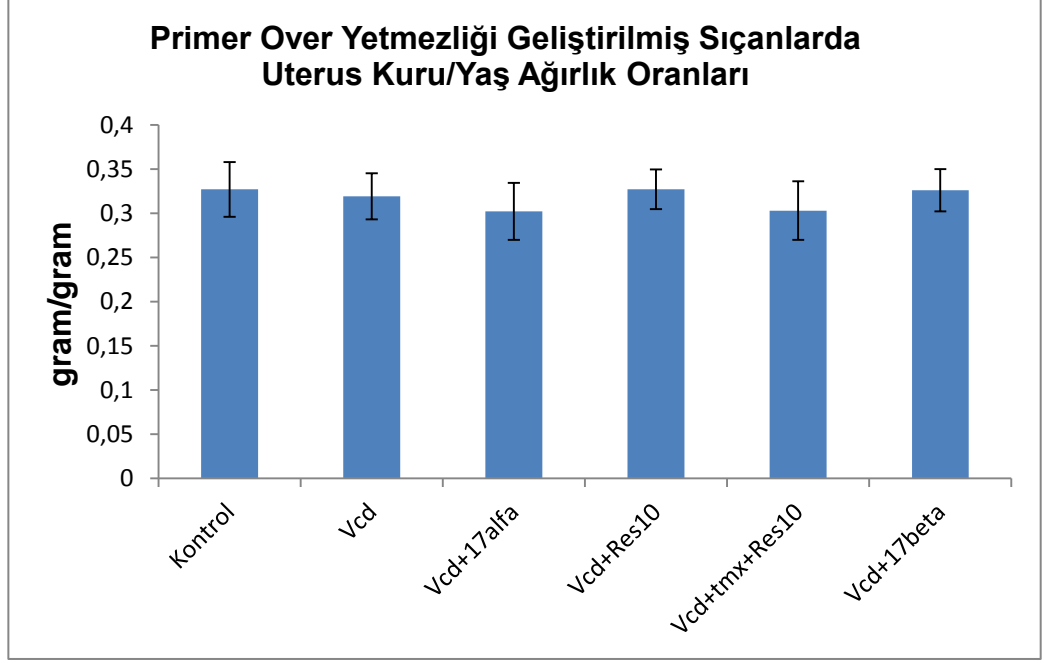
Şekil 10. İmmatür Sıçanlarda Kuru/Yaş Ağırlık Oranları (n=6)

(*)=Kontrolden farklı (*)=p<0,05
(^)=17alfaEE den farklı (^^^)=p<0,001

İmmatür sıçanlarda uterus kuru/yaş ağırlık(UK/UY) oranları karşılaştırıldığında kontrole göre 17alfa EE ve FLV verilen grupta UK/UY oranında anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,05). RES10+FLV verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmasa bile ortalama değerlere bakıldığında artış olduğu izlenmektedir. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında bir anlamlılık saptanmamıştır. Bu da Şekil 8 de görülen fulvestrantın etkisi ile oluşan değişikliklerle uyumlu olarak izlenmektedir. Bu gruplarda her ne kadar UA/VA oranı fulvestrant tarafından azaltılmış olsa da bu muhtemelen doku protein düzeyinin göreceli olarak yüksek olmasıyla ilişkilendirilebilir.

17alfa EE ile 17alfa EE+FLV verilen grup karşılaştırıldığında, 17alfa EE+FLV verilen grupta UK/UY oranının anlamlı oranda arttığı gözlenmektedir(p<0,001).

4-2-2.Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları

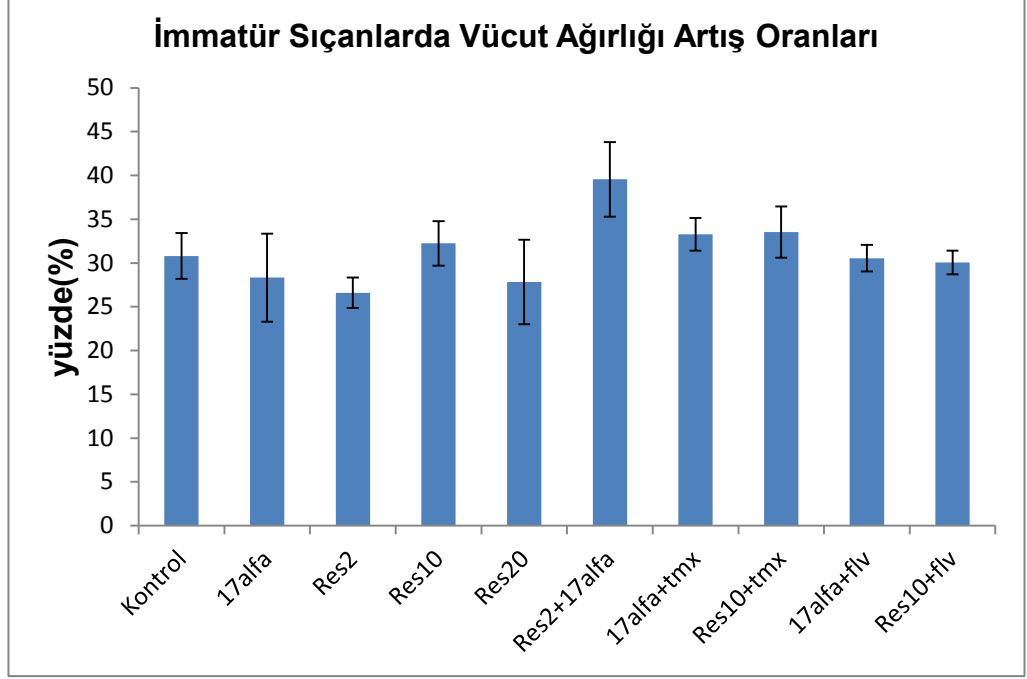


şekil 11. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Uterus Kuru/Yaş Ağırlık Oranları (n=6)

Bu çalışmada gruplar arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir.

4-3.Vücut Ağırlığı Artış Oranları

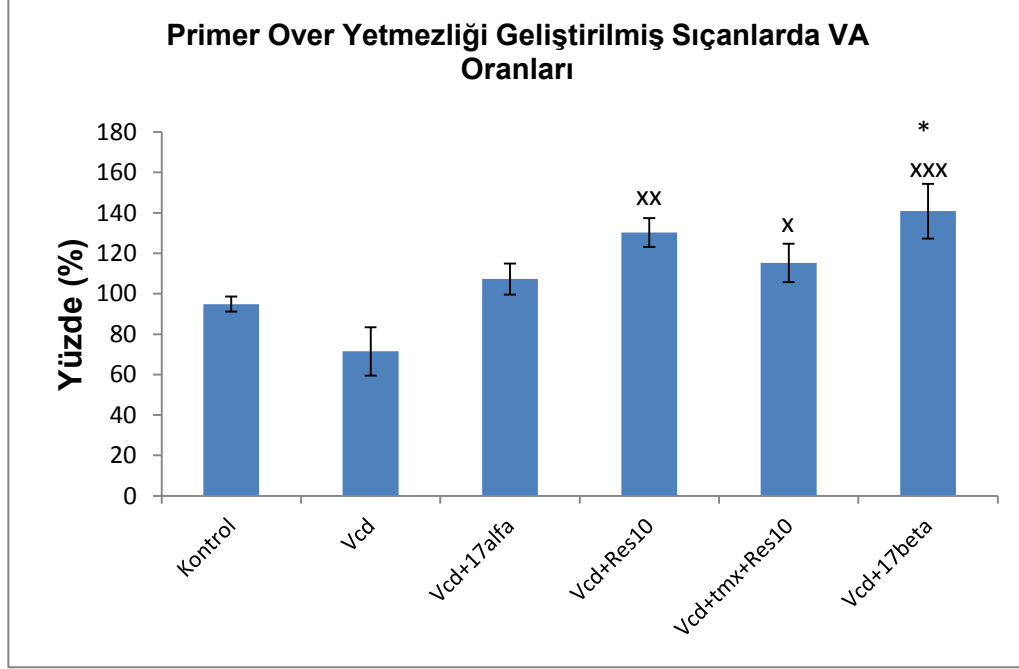
4-3-1.İmmatür Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Artış Oranları



Şekil 12. İmmatür Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Artış Oranları(%) (n=6)

Bu çalışma grubunda gruplar arasında anlamlılık tespit edilmemiştir.

4-3-2.Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Artış Oranları



Şekil 13. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Oranları (n=6)
(x)=VCD den farklı (x)=p<0,05 (xx)=p<0,01
(*)=Kontrol den farklı (*)=p<0,05

POY geliştirilmiş sıçanlarda vücut ağırlığı artış oranları karşılaştırıldığında kontrol grubu ve VCD grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak ortalama değerler açısından VCD grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarının daha düşük olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında 17 beta E grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmektedir (p<0,05). Kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığı artış değerleri VCD ile birlikte RES10 ve 17beta E verilen grupların ortalama vücut ağırlığı artış değerlerinin altında kalmıştır.

VCD+RES10 verilen grupta vücut ağırlığı artış oranlarının ortalama değerlerinin RES 10 verilen grup lehine arttığı izlenmektedir. Aynı artış VCD+17beta E verilen grupta da göze çarpmaktadır (p<0,05). Bu bizi RES 10 ile 17beta E nin vücut ağırlığı artış oranlarında benzer etki gösterdiği sonucuna götürebilir. Ortalama yüzde

değerlerine bakıldığında bu iki grubun değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülebilir.

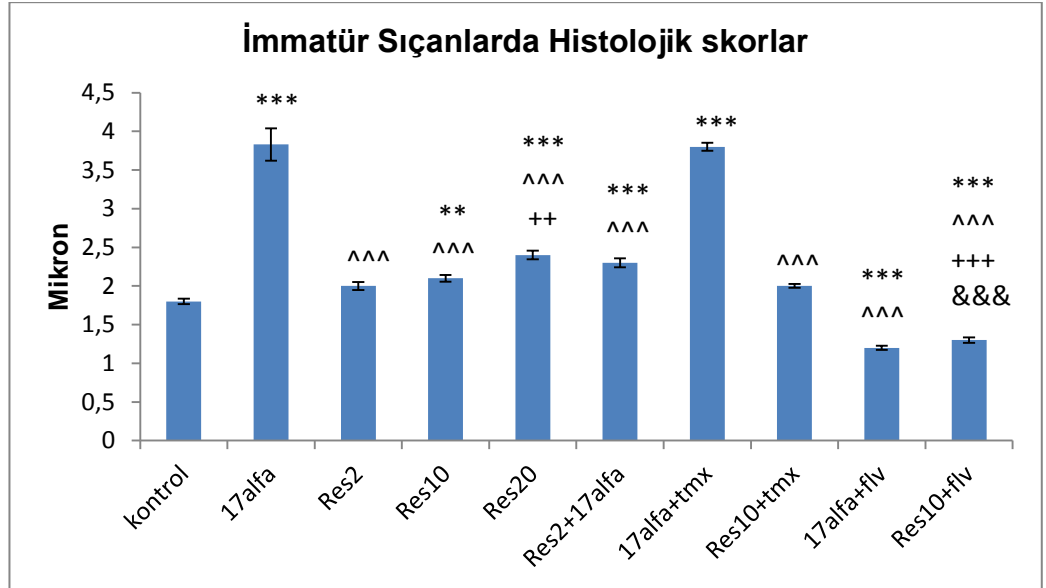
VCD verilen grupta, VCD+RES10 verilen grup arasında, vücut ağırlığı oranları bakımından, VCD ile birlikte resveratrol verilen grup lehine bir artış olduğu görülmektedir($p<0,01$).

Yine VCD ile birlikte 17beta E verilen grupta da, resveratrol verilen gruba yakın değerlerde bir artış olduğu gözle çarpmaktadır($p<0,001$).

VCD ile birlikte TMX ve RES10 verilen grupta, vücut ağırlığı artışında kontrole göre anlamlı bir artış olmuştur($p<0,05$). Ancak bu grup VCD ile birlikte resveratrol verilen grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür.

4-4.Histolojik bulgular

4-4-1.İmmatür Sıçanlarda Histolojik Skorlar



Şekil 14. İmmatür Sıçanlarda Histolojik Skorlar (Endometrium kalınlığı baz alınmıştır.) (n=6)
(*)=Kontrolden farklı (**)= $p<0,01$ (***)= $p<0,001$
(^)=17 alfa EE den farklı (^^)= $p<0,001$
(+)=Res10 dan farklı (++)= $p<0,01$ (+++)= $p<0,001$
(&)=Res10+TMX den farklı (&&&)= $p<0,001$

İmmatür sıçanlarda değerlendirme yapılırken endometrium kalınlığı baz alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bu doğrultuda kontrole göre;

- ✓ 17alfa EE verilen grupta kontrol grubuna göre endometrium kalınlığında anlamlı bir artış söz konusudur($p<0,001$).
- ✓ RES10 verilen grupta da yine kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göze çarpmaktadır($p<0,01$)
- ✓ RES20 verilen grupta kontrol grubuna göre ortalama değerleri yükselerek anlamlı bir artış izlenmektedir($p<0,001$).

RES2, RES10, RES20 verilen grupların ortalama endometrium kalınlık değerlerine bakıldığında kademeli olarak bir yükseliş söz konusudur. Bu da resveratrolün doz bağımlı etkisinin olabileceği şüphesini uyandırmaktadır.

RES2+17alfa EE verilen grupta da kontrol değerlerine göre endometrium kalınlığında anlamlı bir artış göze çarpmaktadır ($p<0,001$). RES10+TMX verilen grup ile kontrol grubunun ortalama değerleri birbirine çok yakındır, kontrol grubuna göre endometrium kalınlığında anlamlı bir artış olmamıştır.

Ancak 17alfa EE+FLV ve RES10+FLV verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrole göre endometrium kalınlığında düşme olduğu göze çarpar($p<0,001$). Bu da fulvestrantın antagonist etkisi ile ilişkilendirilebilir.

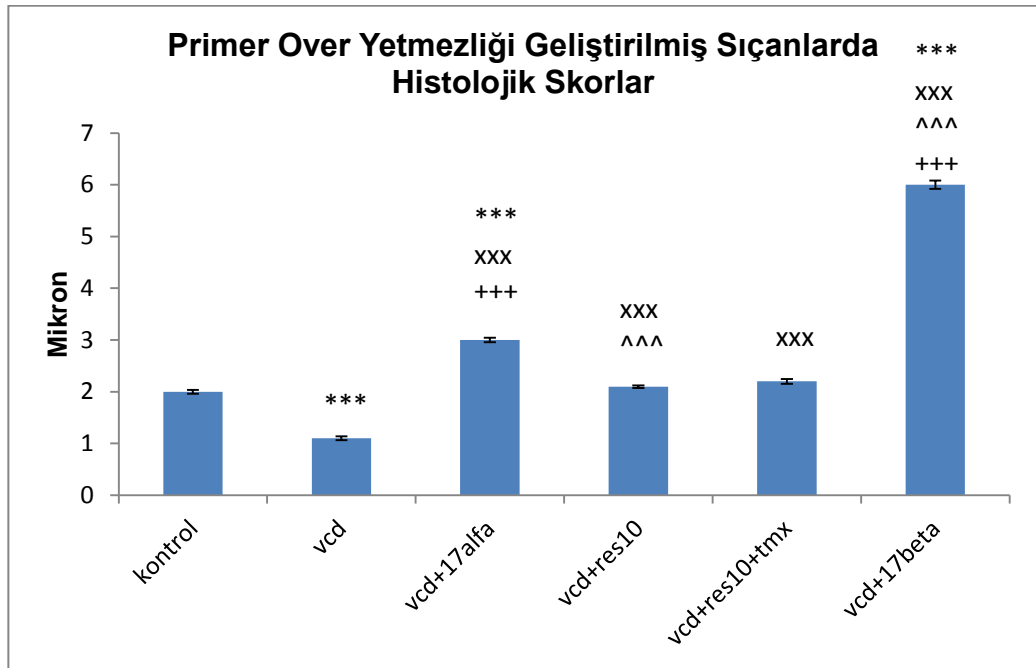
17alfa EE verilen grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında RES2, RES10, RES20, RES2+17alfa EE verilen gruplarda endometrium kalınlığında azalma olduğu görülmektedir($p<0,001$).Yine 17alfa EE+FLV ve RES10+FLV verilen gruplarda da anlamlı bir azalma söz konusudur ($p<0,001$). Ancak bu grupların ortalama endometrium kalınlık değerleri diğer gruplara oranla daha düşüktür. Bu da burada da fulvestrantın antagonist etkisinin baskın olduğu şeklinde yorumlanabilir.

RES10 verilen grupla RES20 verilen grup karşılaştırıldığında RES20 verilen grubun endometrium kalınlığını RES10 verilen gruba göre anlamlı derecede artırdığı gözlenmektedir ($p<0,01$). Bu sonuçta etki görülen en düşük dozun 10 mg/kg resveratrol olduğunu doğrulamaktadır. RES10 verilen grup ile RES10+FLV verilen grup karşılaştırıldığında RES10 un FLV ile birlikte verilmesinin endometrium kalınlığında

düşüşe neden olduğu sonucuna varılır($p<0,001$). Fulvestrant endometrium kalınlığını burada da düşürmüştür. RES10 verilen grup, RES10+TMX verilen grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır. Ancak iki grubun ortalama değerlerine bakıldığında RES10+TMX verilen grubun ortalama değerlerinde azda olsa bir düşme olduğu göze çarpmaktadır.

RES10+TMX ile RES10+FLV verilen grup birbiri ile karşılaştırıldığında RES10+FLV verilen grupta anlamlı bir düşüş söz konusu olduğu görülmektedir($p<0,001$). Fulvestrant, tamoksifene göre endometrium kalınlığını azaltmıştır.

4-4-2. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Histolojik Skorlar



Şekil 15. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Histolojik Skorlar (Endometrium kalınlığı baz alınmıştır.) (n=6)

(*)=Kontrolden farklı (***)= $p<0,001$
(x)=VCD den farklı (xxx)= $p<0,001$
(^)=VCD+17alfa EE den farklı (^^^)= $p<0,001$
(+)=VCD+RES10 dan farklı (+++)= $p<0,001$

POY geliştirilmiş sıçanlarda kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında;

✓ VCD verilen grupta kontrol grubuna göre endometrium kalınlığında anlamlı bir düşme olduğu görülmektedir ($p<0,001$).

✓ VCD+17alfa EE verilen grupta kontrole göre endometrium kalınlığında bir artış söz konusudur ($p<0,001$).Burada 17alfa EE ün endometriumda VCD ile oluşan hasarı bir miktar iyileştirdiğinden söz edilebilir.

✓ VCD+RES10 verilen grubun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise endometrium kalınlığında anlamlı bir artma bulunmamaktadır.

✓ VCD+RES10+TMX verilen grupta da kontrole göre endometrium kalınlığında anlamlı bir artış ile karşılaşılmamıştır. Bu iki grubun ortalama değerleri birbirlerine oldukça yakındır.

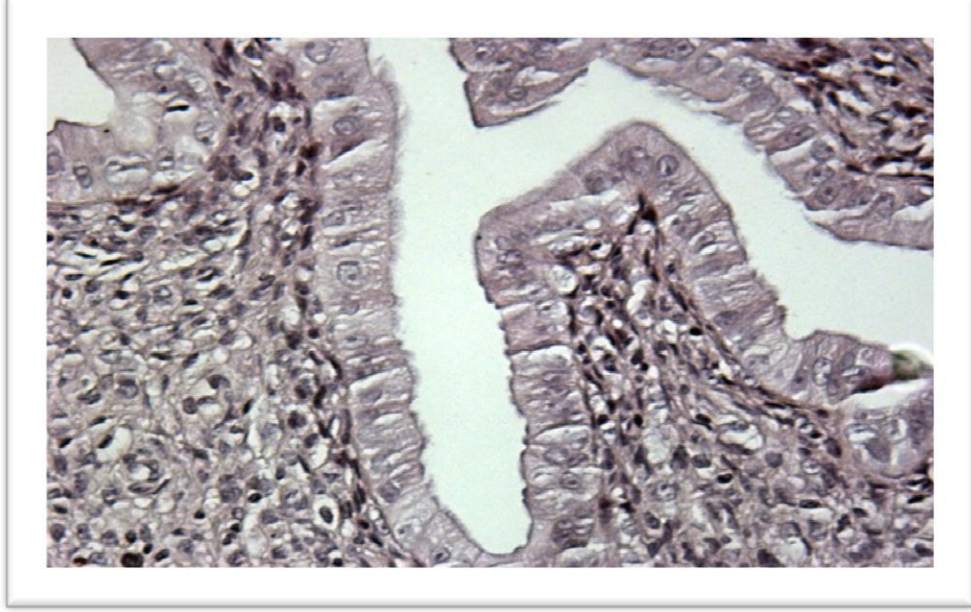
✓ VCD+17beta E verilen gruba bakıldığında, bu grubun ortalama değerlerinin kontrole göre oldukça yüksek olduğu açıkça görülmektedir. İstatistiksel olarak anlamlılığı $p<0,001$ düzeyindedir.

VCD+17alfa EE verilen grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, VCD+RES10 verilen grubun endometrium kalınlığının anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0,001$), VCD+17beta E verilen grubun endometrium kalınlığının ise ortalama değer açısından 17alfa EE den çok yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Bu grubun istatistiksel olarak anlamlılığı $p<0,001$ düzeyindedir.

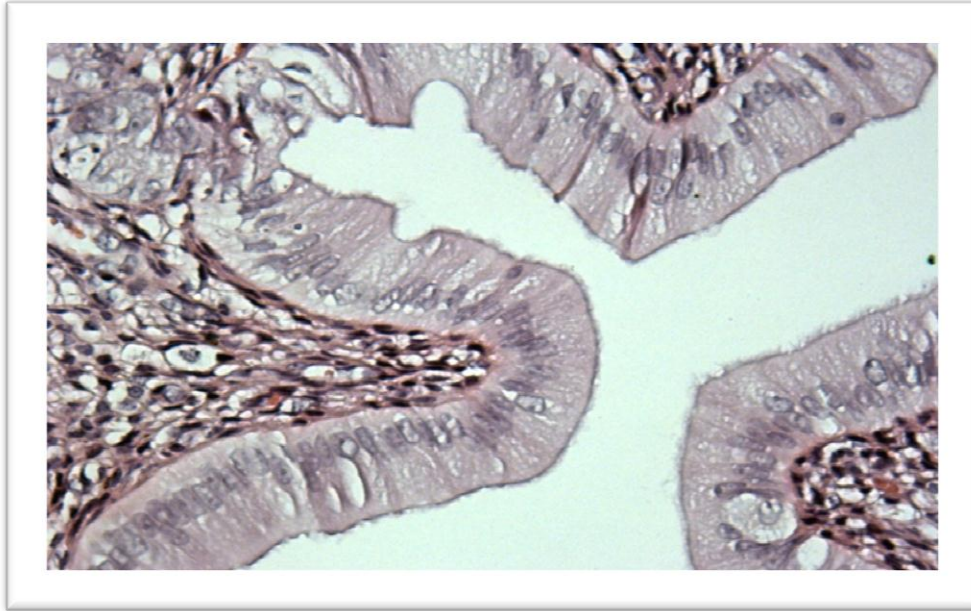
VCD verilen grup ile diğer grupların karşılaştırılmasında da VCD+17alfa EE, VCD+RES10, VCD+RES10+TMX ve VCD+17beta E verilen gruplarda endometrium kalınlığında artış olduğu görülebilir($p<0,001$).Buradaki en fazla artışı 17beta E nin yaptığı aşıkardır.

VCD+RES10 ile VCD+17alfa EE ve VCD+17beta E karşılaştırmasında endometrium kalınlığının her iki grupta RES10 ile tedavi edilen gruba göre anlamlı derecede fazla olduğu görülmektedir ($p<0,001$).Yine VCD+17beta E verilen grubun ortalama endometrium kalınlığı değerlerine bakıldığında, bu grupta endometrium kalınlığının oldukça fazla olduğu izlenebilir. VCD+RES10 ve VCD+RES10+TMX verilen grubun karşılaştırılmasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilememiştir.

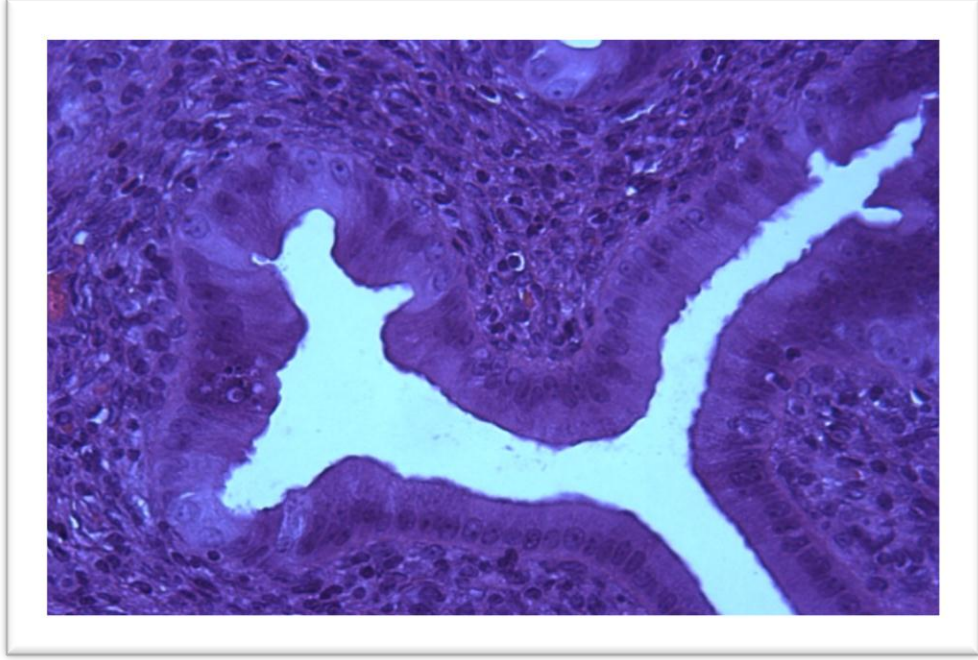
4-4-3.Histolojik resimler



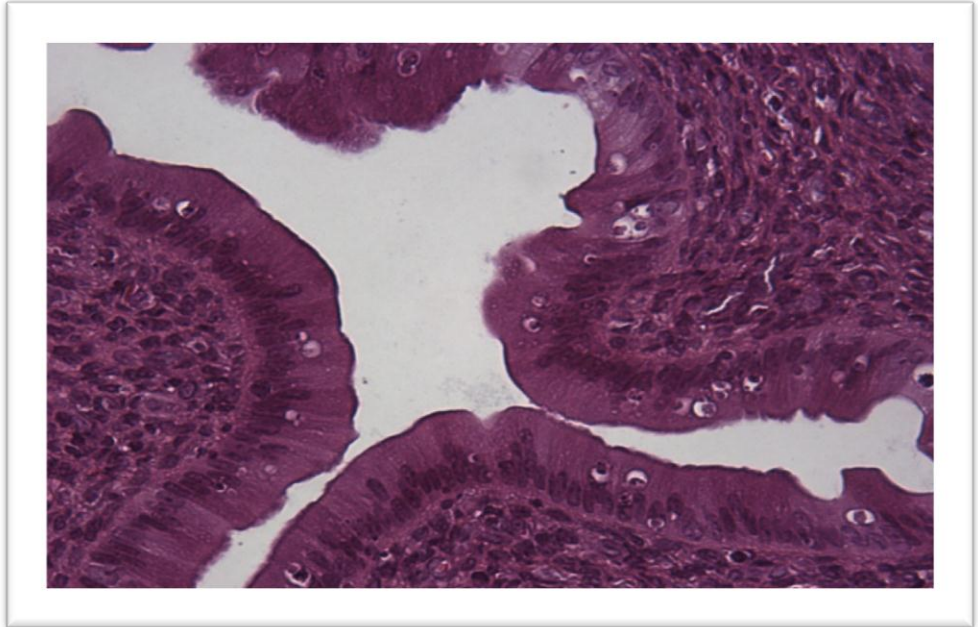
Şekil 16. İmmatür sıçan çalışmasında kontrol grubunda uterus histolojik incelemesi. Uterus atrofik, endometriyum epiteli küboidal ve kısa, bağdokusu hücreleri az ve yuvarlak nükleusa sahip. Yapılan endometriyum epiteli ölçüm ortalaması 1,8 mikron olarak tespit edilmiştir.(H.E. X400)



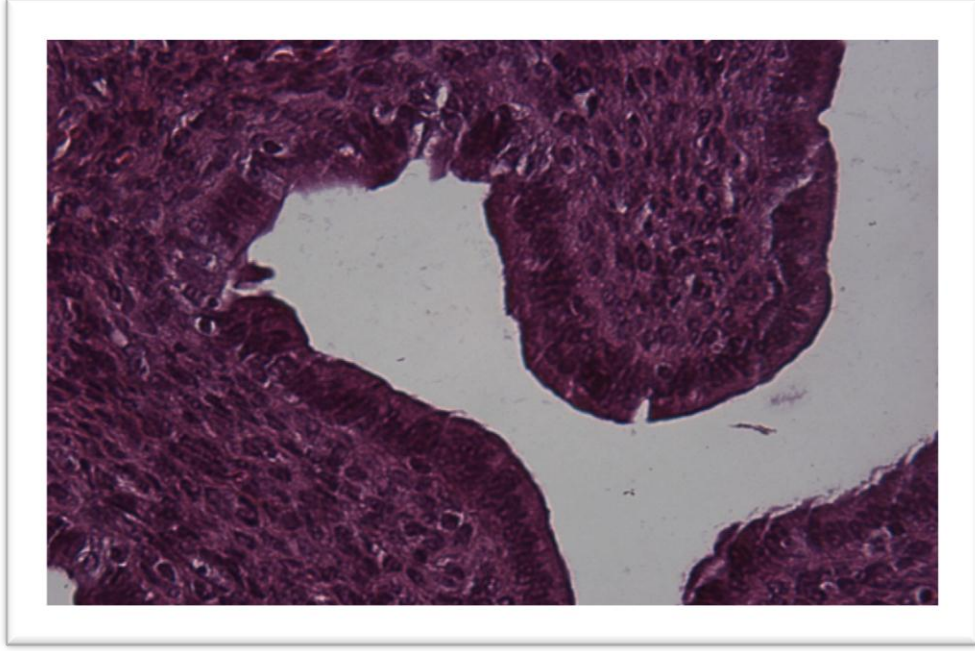
Şekil 17. İmmatür sıçan çalışmasında 7alfaEE grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre artmış, yapılan ölçümde ortalama epitelyum yüksekliği 4,0 mikron olarak tespit edildi. Endometriyal lamina propriyada bulunan hücreler iğ şeklinde ve koyu nükleus içermektedir. Uterus hipertrofik. Ayrıca çok sayıda mitotik hücre tespit edilmiştir.(H.E.X400)



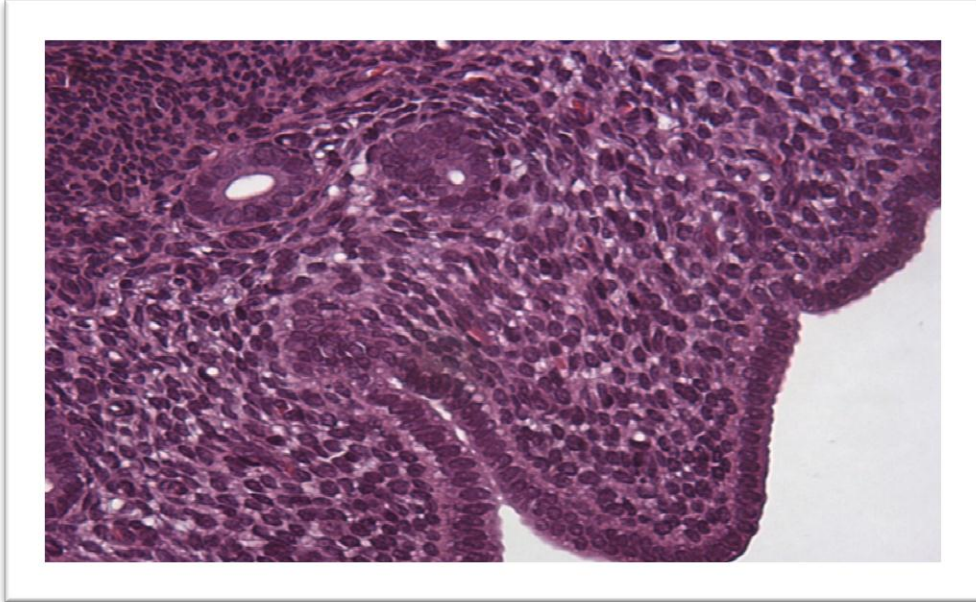
Şekil 18. İmmatür sıçan çalışmasında RES2+17alfa EE grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre artmış, 17 alfa grubuna göre daha kısa olarak görüldü, yapılan ölçümde ortalama epitelyum yüksekliği 2,3 mikron olarak tespit edildi. Endometriyal lamina propriyada bulunan hücreler iğ şeklinde ve koyu nükleus içermektedir. Uterus hipertrofik. Kontrol grubuna göre daha fazla sayıda mitotik hücre tespit edilmiştir. (H.E.X400)



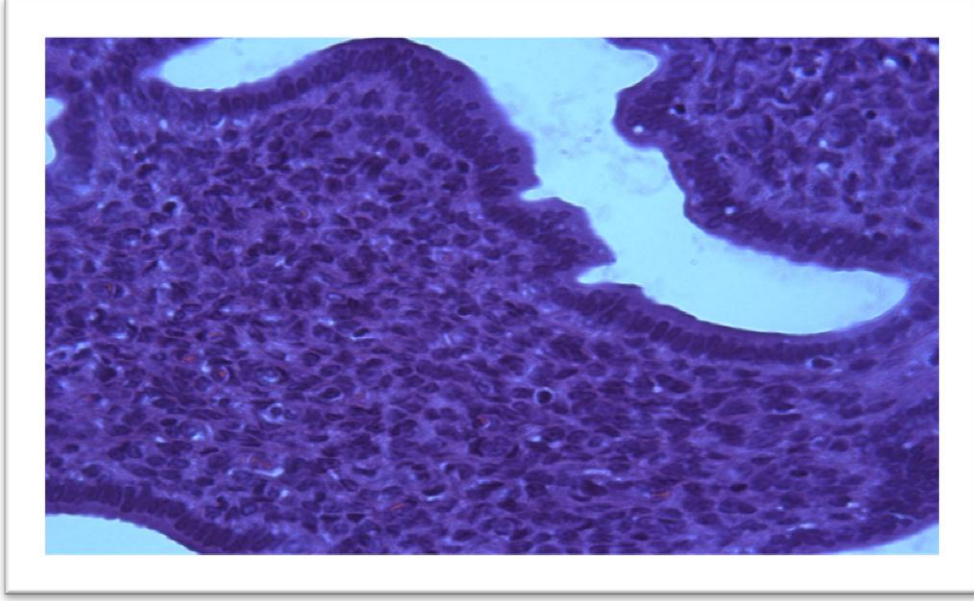
Şekil 19. İmmatür sıçan çalışmasında 17alfaEE+TMX grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre artmış, yapılan ölçümde ortalama epitelyum yüksekliği 3,8 mikron olarak tespit edildi. Endometriyal lamina propriyada bulunan hücreler iğ şeklinde ve koyu nükleus içermektedir. Uterus hipertrofik. Ayrıca çok sayıda mitotik hücre tespit edilmiştir. (H.E.X400)



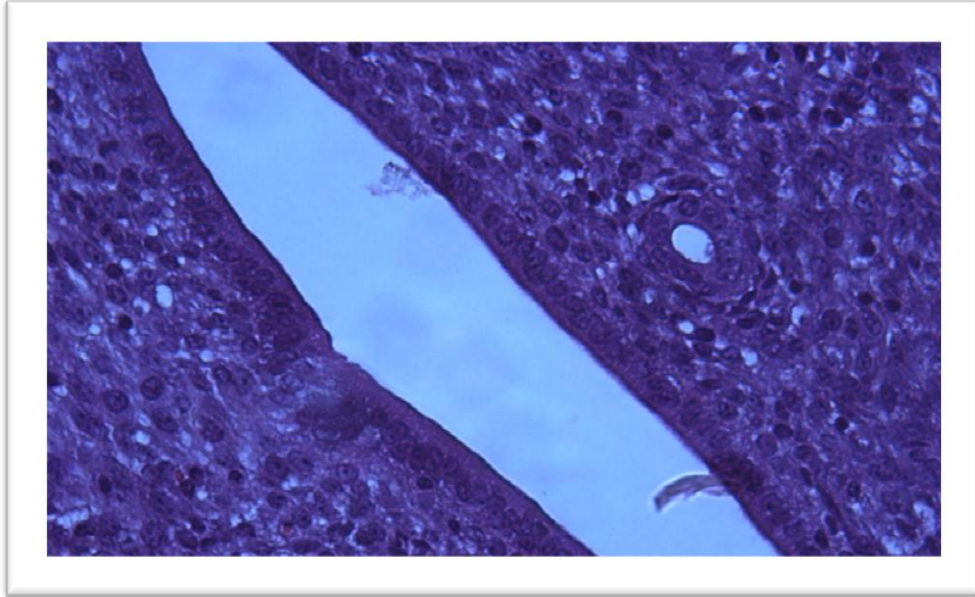
Şekil 20. İmmatür sıçan çalışmasında RES10+TMX grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre artmış, 17 alfa grubuna göre daha kısa olarak görüldü, yapılan ölçümde ortalama epitelyum yüksekliği 2 mikron olarak tespit edildi. Endometriyal lamina propriyada bulunan hücreler kısmen iğ şeklinde ve koyu nükleus içermektedir. Uterus hipertrofik olarak değerlendirildi. (H.E.X400)



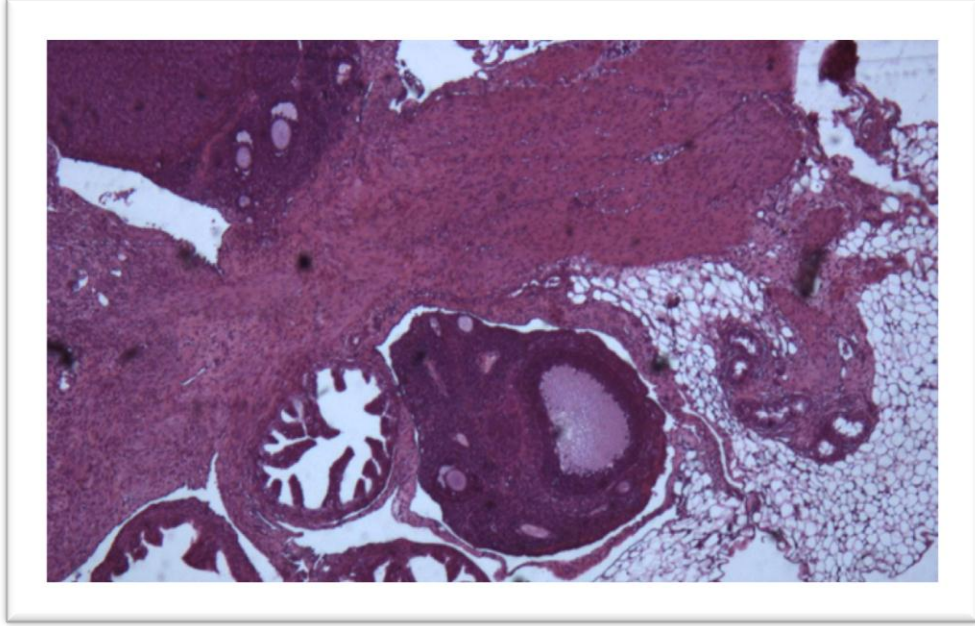
Şekil 21. İmmatür sıçan çalışmasında 17alfa EE+FLV grubunda uterus histolojik incelemesi. Uterus atrofik, endometriyum epiteli küboidal ve kısa, bağdokusu hücreleri az ve yuvarlak nükleusa sahip. Yapılan endometriyum epiteli ölçüm ortalaması 1.2 mikron olarak değerlendirildi. (H.E.X400)



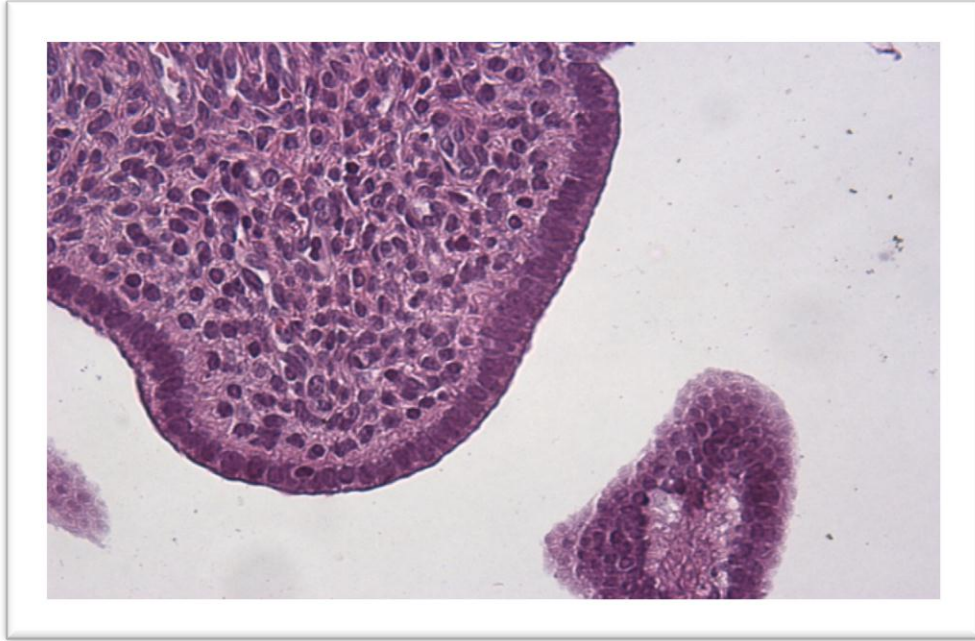
Şekil 22. İmmatür sıçan çalışmasında RES10+FLV grubunda uterus histolojik incelemesi. Uterus atrofik, Endometriyum epiteli küboidal ve kısa, bağdokusu hücreleri az ve yuvarlak nükleusa sahip. Yapılan endometriyum epiteli ölçüm ortalaması 1.3 mikron olarak değerlendirildi. (H.E.X400)



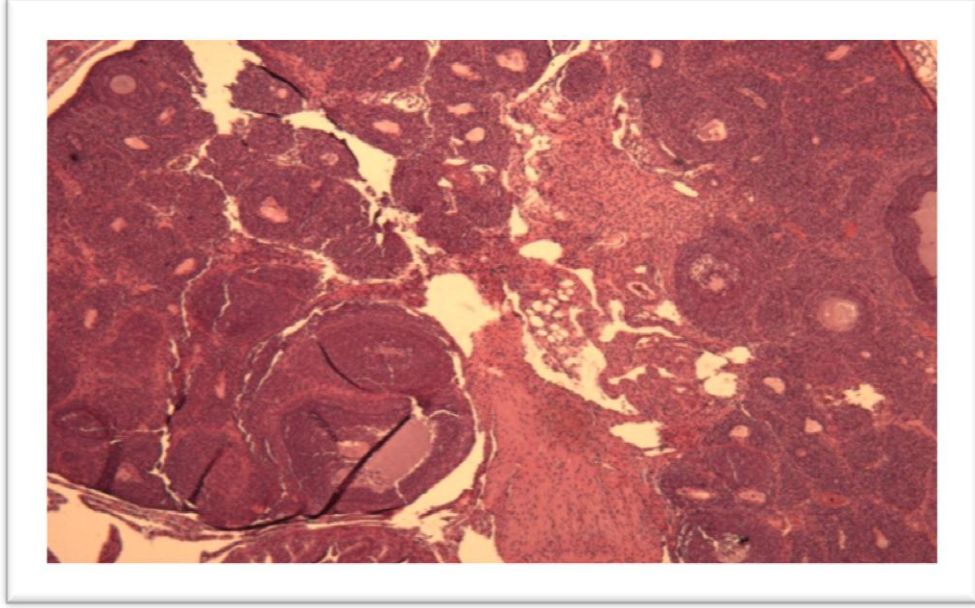
Şekil 23. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında kontrol (DMSO) grubunda uterus histolojik incelemesi. Uterus atrofik, endometriyum epiteli küboidal ve kısa, bağdokusu hücreleri az ve yuvarlak nükleusa sahip. Yapılan endometriyum epiteli ölçüm ortalaması 1,2 mikron dur.(H.E.X400)



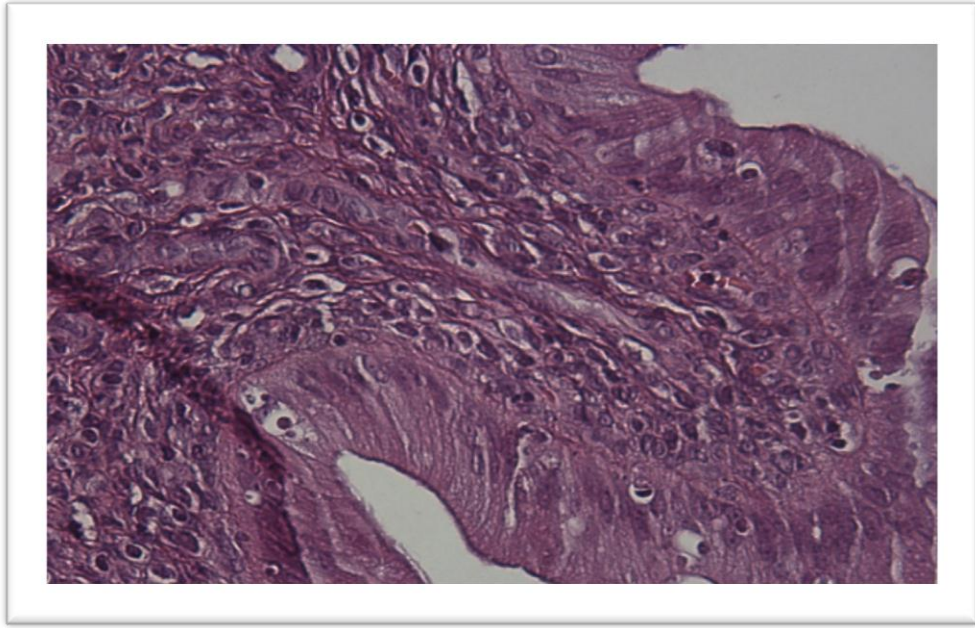
Şekil 24. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında kontrol (DMSO) grubunda over histolojik incelemesi. Overin histolojik incelemesinde primer ve primordial follüküllerin az olduğu tespit edilmiştir. (H.E.X400)



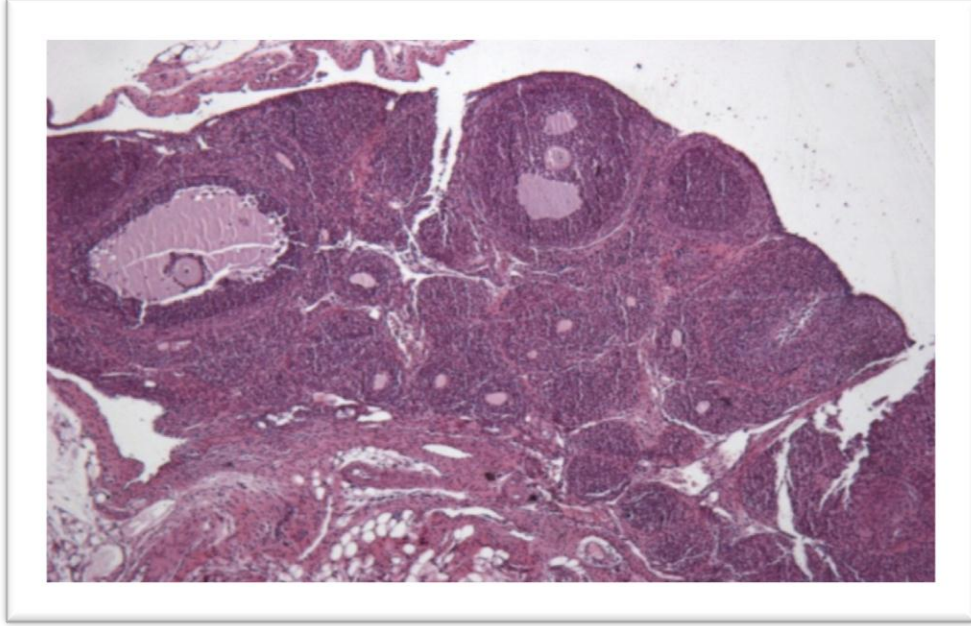
Şekil 25. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD grubunda uterus histolojik incelemesi. Uterus atrofik, endometriyum epiteli küboidal ve kısa, bağdokusu hücreleri az ve yuvarlak nükleusa sahip. Yapılan endometriyum epiteli ölçüm ortalaması 1.1 mikron olarak değerlendirildi. (H.E.X400)



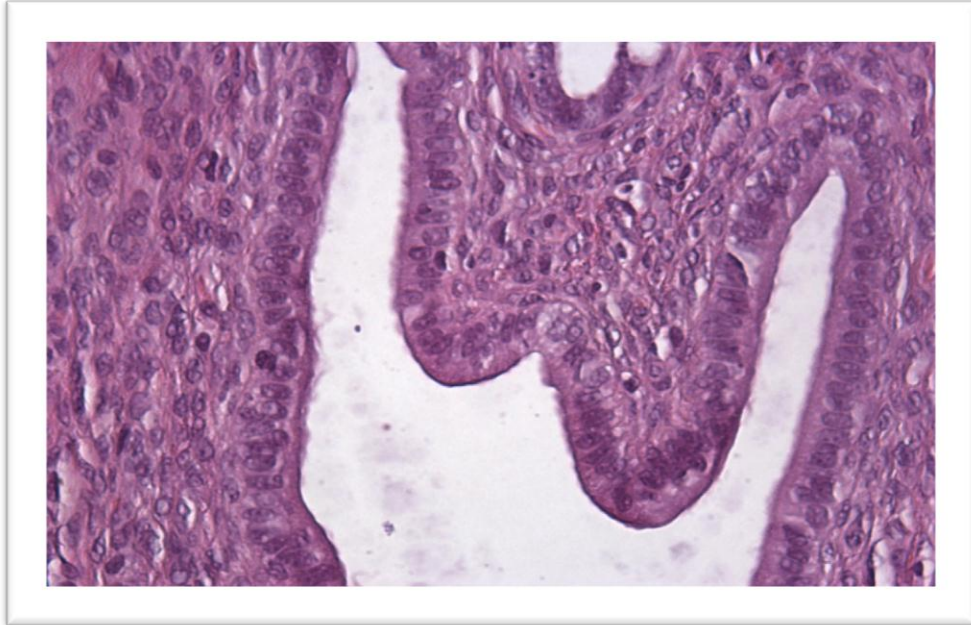
Şekil 26. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD grubunda over histolojik incelemesi. Ovaryumda bulunan primer ve primordial folliküllerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çok azaldığı tespit edildi. Ayrıca folliküllerde atrezi olduğu görüldü. (H.E.X400)



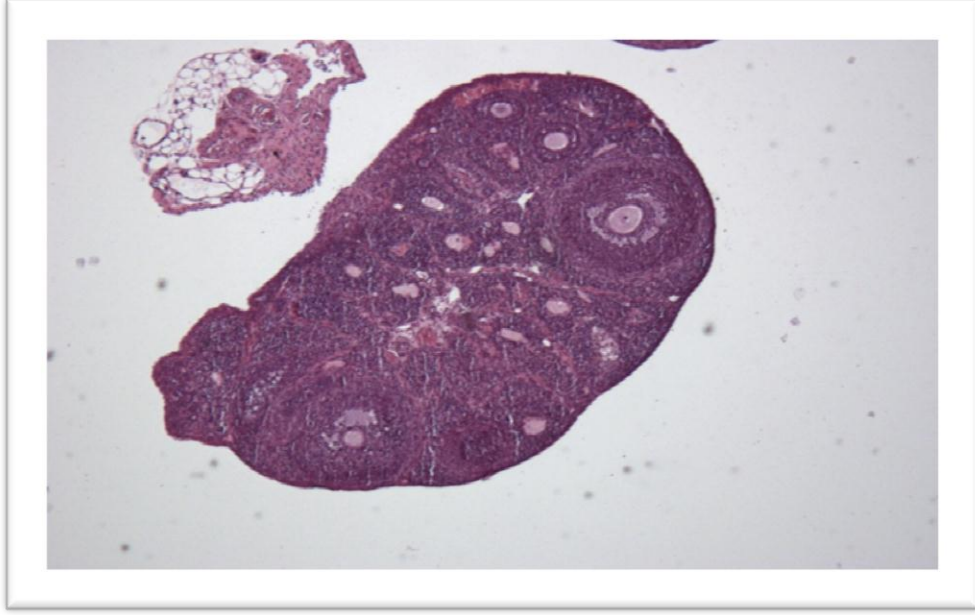
Şekil 27. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+17 alfa grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre artmasına rağmen 17 alfa grubuna göre daha kısa olarak görüldü. Yapılan ölçümde endometriyum yüksekliği 3 mikron ölçüldü. Bağ dokusu hücreleri 17 alfa grubuna göre daha az ve yuvarlak nükleusa sahip. (H.E.X400)



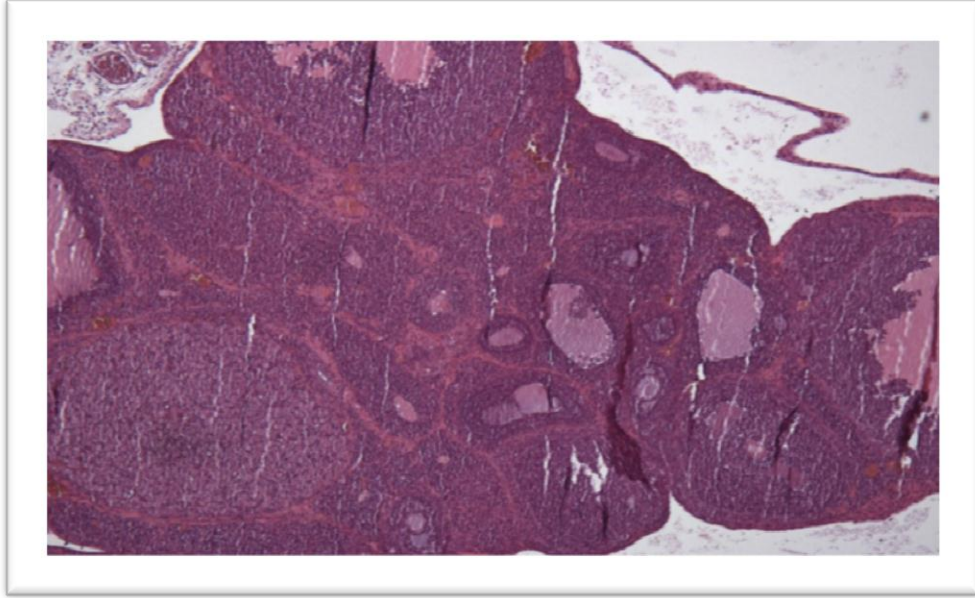
Şekil 28. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+17 alfa grubunda over histolojik incelemesi. Ovaryumda bulunan primer ve primordial follikül sayısında VCD grubu ile karşılaştırıldığında her hangi bir artış tespit edilmedi. (H.E.X400)



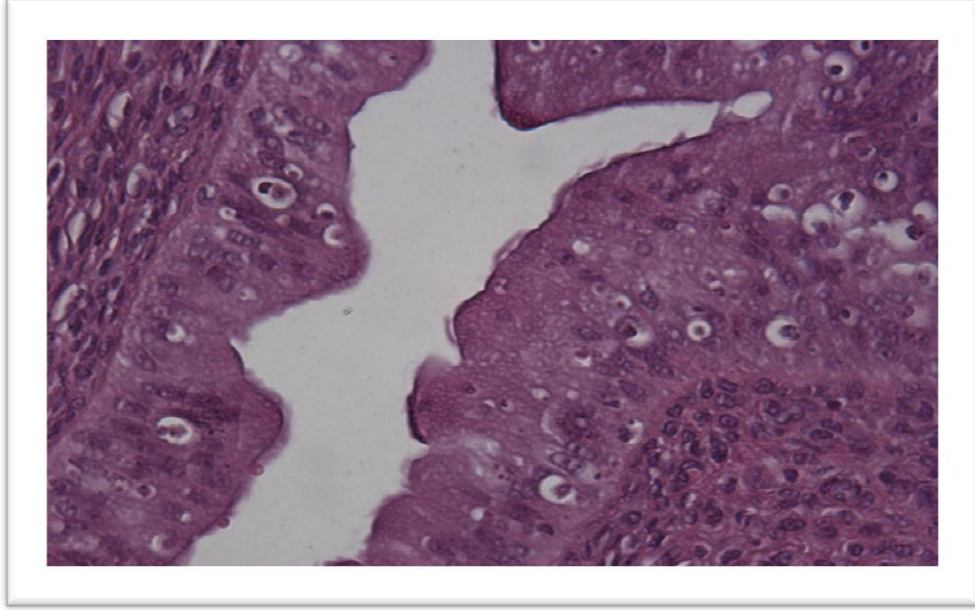
Şekil 29. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+RES10 grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği VCD grubuna göre artmış, resveratrol 10 mg grubu ile karşılaştırıldığında aynı olarak görüldü, yapılan ölçümde ortalama epitelyum yüksekliği 2,1 mikron olarak tespit edildi. Endometriyal lamina propriyada bulunan hücreler kısmen iç şeklinde ve koyu nükleus içermektedir. Uterus hipertrofik olarak değerlendirildi. (H.E.X400)



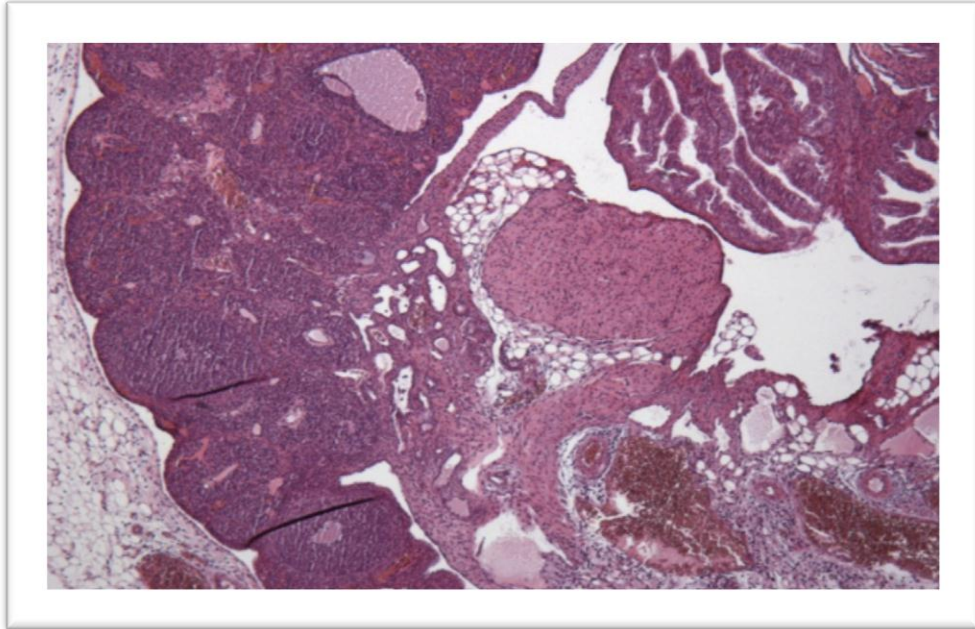
Şekil 30. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+RES 10 grubunda over histolojik incelemesi. Ovaryumda bulunan primer ve primordial folliküllerin VCD grubu ile karşılaştırılmasında arttığı tespit edildi. VCD+ 17 alfa EE grubuna göre ise folliküllerin sayıca arttığı tespit edilmiştir. (H.E.X400)



Şekil 31. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+RES10+TMX grubunda over histolojik incelemesi. Ovaryumda bulunan primer ve primordial folliküllerin sayısı VCD grubuna göre artmış olmasına rağmen RES10+VCD grubuna göre daha az arttığı tespit edilmiştir. (H.E.X400)



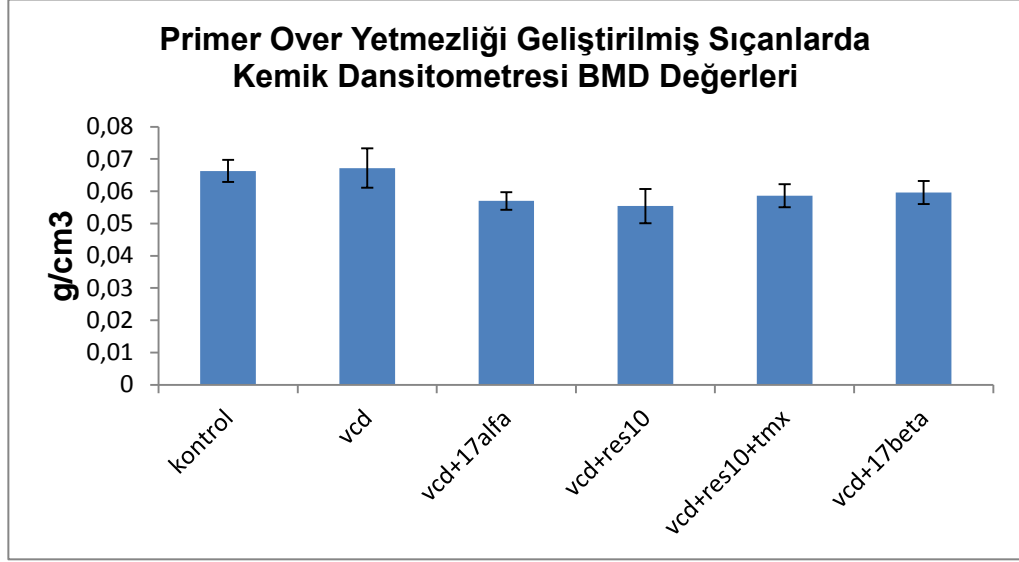
Şekil 32. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+17beta E grubunda uterus histolojik incelemesi. Endometriyum epiteli yüksekliği kontrol grubuna göre çok fazla miktarda artıp 7 mikrona çıkmıştır. Bağ dokusunda bulunan hücreler iğ şeklinde ve koyu renkli nükleus içermektedir. Mitotik hücreler oldukça fazla sayıda görülmüştür. (H.E.X400)



Şekil 33. POY geliştirilmiş sıçan çalışmasında VCD+17 beta E grubunda over histolojik incelemesi. Ovaryumda bulunan primer ve primordial folliküllerde VCD grubuna göre herhangi bir artış görülmemiştir.(H.E.X400)

4-5.Kemik Dansitometre Bulguları

4-5-1.Primer over yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda kemik dansitometre bulguları

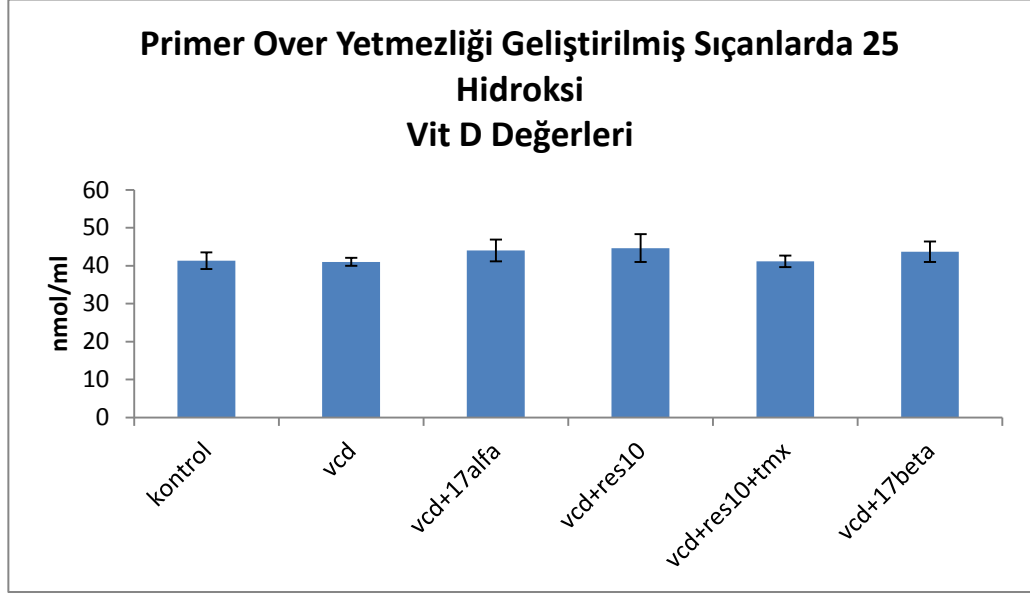


Şekil 34. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Kemik Dansitometre Bulguları (n=6)

Kemik dansitometresi sadece primer over yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda çalışılmıştır. Bu çalışma grubunda gruplar arasında bir anlamlılık tespit edilememiştir.

4-6.Kan Analizi Bulguları

4-6-1.Primer over yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda 25 hidroksi vitamin d değerleri

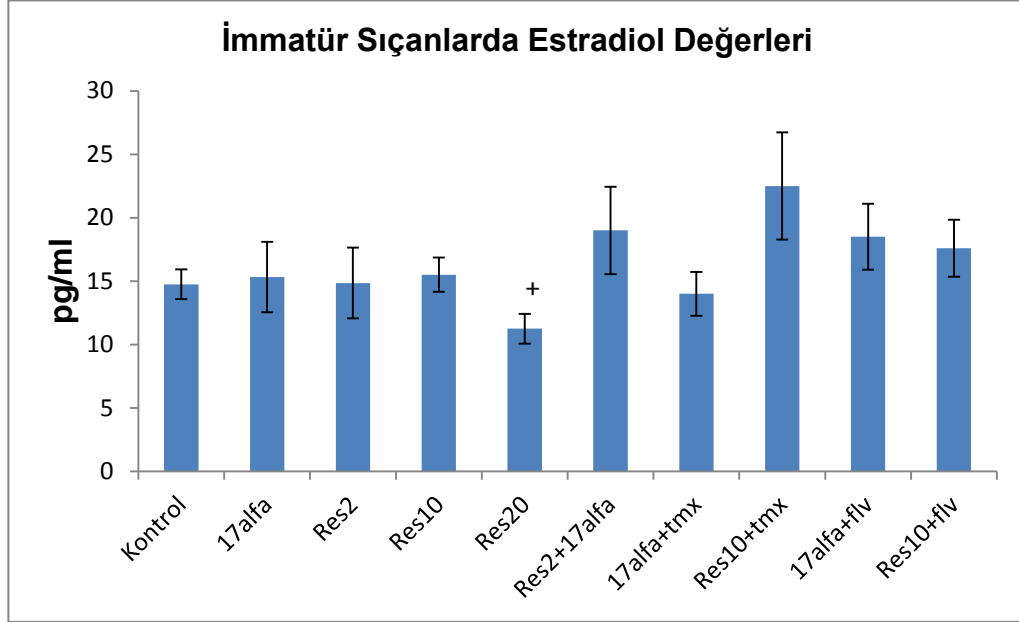


şekil 35. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda 25 Hidroksi Vitamin D Değerleri (n=6).

Serum Vitamin D değerleri sadece Primer Over Yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda çalışılmıştır.

Bu alışma grubunda gruplar arasında bir anlamlılık tespit edilememiştir.

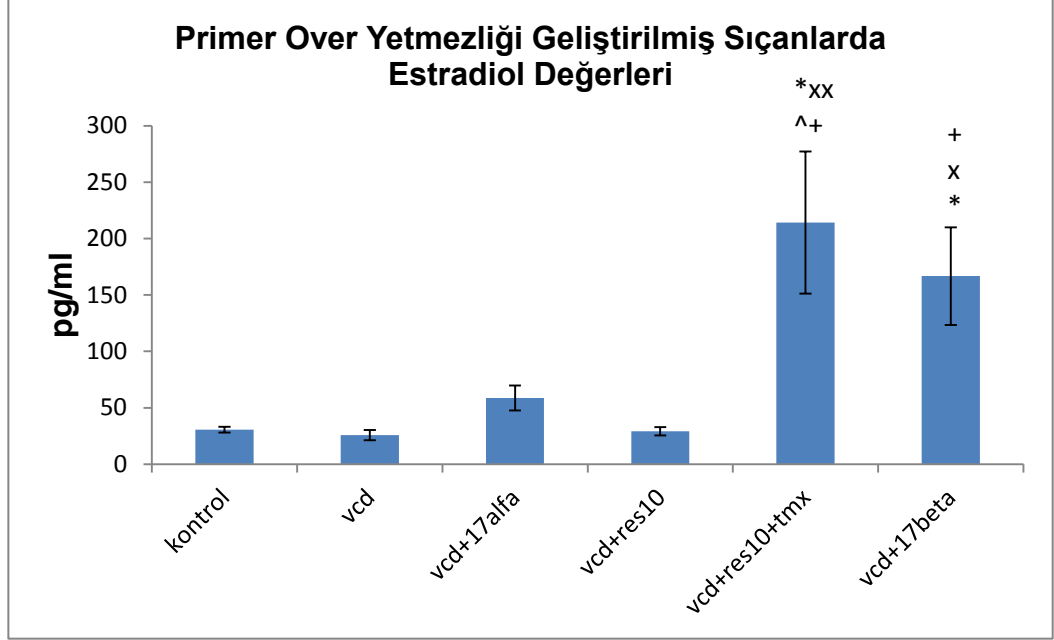
4-6-2.İmmatür Sıçanlarda Estradiol Değerleri



Şekil 36. İmmatür Sıçanlarda Estradiol Değerleri (n=6).
(+)=RES10 dan farklı

İmmatür sıçanlarda estradiol değerlerinde kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında gruplar arasında bir anlamlılık tespit edilememiştir. Ancak RES10 grubu ile RES20 grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir düşme göze çarpmaktadır ($p<0,05$). Bu da resveratrolün estrojenik etkisinin doz bağımlı olarak azalmış olabileceği şüphesini uyandırmaktadır.

4-6-3.Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Estradiol Değerleri



Şekil 37. Primer Over Yetmezliği Geliştirilmiş Sıçanlarda Estradiol Değerleri (n=6).

(*)=Kontrolden farklı, (*)=p<0,05

(x)=VCD den farklı, (x)=p<0,0, (xx)=p<0,01

(^)=VCD+17alfaEE den farklı, (^)=p<0,05

(+)= VCD+RES10 den farklı, (+)=p< 0,05

Primer Over Yetmezliği geliştirilmiş sıçanlarda estradiol seviyeleri değerlendirmesinde kontrol grubu ile VCD+RES10+TMX grubu karşılaştırıldığında VCD+RES10+TMX grubu lehine estradiol seviyelerinde anlamlı bir yükselme olduğu görülmektedir(p<0,05). Aynı yükselme VCD+17βE grubunda da bulunmaktadır(p<0,05). Ancak VCD+RES10+TMX grubuna göre VCD+17beta E grubunda estradiol seviyelerinde ortalama değer açısından bir düşme olduğu aşikardır. Estradiol düzeyi resveratrol tek başına verildiğinde yükselmiştir ancak bu yükselme anlamlı değildir. Açıkça görülmektedir ki, resveratrol tamoksifen ile birlikte verildiğinde 17alfaEE ve 17betaE kadar etkili olmuştur.

VCD grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, VCD+RES10+TMX (p<0,01) ve VCD+17betaE (p<0,05) verilen gruplarda da yine anlamlı bir artışa rastlanmaktadır. Hatta bu grupların ortalama değerleri, VCD ve diğer grupların ortalama değerlerinin çok üzerindedir.

5-TARTIŞMA

Resveratrolün yıllardır araştırılan bir molekül olduğu ve bu molekülün insan sağlığı üzerinde pek çok faydalı etkisi olduğu bilinmektedir. Bu güne dek resveratrol hakkında yapılan sayısız çalışma bulunmaktadır. Hemen hemen her etkisi araştırılmış ve araştırılmaktadır. Resveratrolün estrojenik etkisi ile ilgili de kısıtlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Ancak bu etkiler yönünden farklı sonuçlar olması nedeniyle net aktivite henüz aydınlığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada resveratrolün estrojenik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma immatür dişi sıçan çalışması ve POY geliştirilmiş puberte dönemindeki dişi sıçan çalışması olarak iki aşama halinde planlanmıştır. Her iki aşamada da ER'lerinin bulunduğu bilinen dokularda etkiler araştırılmıştır. Amaç, resveratrolün bu dokulardaki agonist ve/veya antagonist etkilerini incelemektir. Bu amaçla her iki aşamada UA/VA oranları, UKA/UYA oranları, VA oranları, uterus ve over histolojik değerlendirmesi, kemik dansitometresi, kan estradiol ve D vitamini düzeyleri incelenmiştir.

İmmatür sıçanlarda UA/VA oranları değerlendirmesinde (Şekil=8), resveratrolün UA/VA oranını 17alfa EE ye benzer bir şekilde artırdığı izlenmektedir. Buradaki en düşük anlamlı etki 10 mg/kg resveratrol dozunda görülmektedir. Bu etki tamoksifen ile azaltılmadığı halde, fulvestrant tarafından anlamlı bir şekilde antagonize edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, resveratrolün estradiol ile birlikte kullanıldığında, MCF 7 meme kanser hücrelerinde, estrojenik ve hatta süperestrojenik etkilerine rastlanmıştır (24). Bowers ve arkadaşlarının (9) hamster over hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada resveratrolün agonist/antagonist etkisi olduğu bulunmuştur. Estradiol bulunduğu zaman resveratrolün bazı meme kanser hücrelerinde agonist/antagonist etki gösterdiği oysa estradiol yokken resveratrol etkilerinin antiestrojenik olduğu da farklı bir çalışmada söylenmiştir (6). Ancak Frayberger ve arkadaşları (22), immatür Wistar cinsi dişi sıçanlara 18, 58 ve 575 mg/kg resveratrol ve 0,3, 1, 3, 30 µg/kg etinilestradiolü subkutan (sc) yolla vermişler ve sıçanlarda olabilecek uterotrofik etkiyi araştırmışlar ve bu dozlarda etinilestradiol doz bağımlı olarak uterus ağırlığında artış, uterus lümeninde genişleme, uterus epitelinde hipertrofi oluştururken,

resveratrol uterus ağırlığında az da olsa bir düşme meydana getirmiş, histolojik incelemede ise resveratrolün uterusta kontrole göre bir değişim yaratmadığı saptanmıştır. Bu sonuç bizim bulgularımızla zıt yönde bir sonuçtur. Bu çalışmadaki doz miktarı oldukça yüksektir. Ancak bu çalışmada dikkat çeken başka bir bulgu da nükleer ER α proteininin resveratrol ile tedavi edilen sıçanlarda doz bağımlı olarak azalmasıdır. Doza bağımlı olarak ER α ve progesteron reseptör proteini mRNA'nın azaldığı tespit edilmiştir. Bu resveratrolün agonist etki gösterdiğini düşündürebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada, Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlara 1, 4, 10, 40, 100 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozlarda oral gavaj yolu ile resveratrol verilmiş ve bu çalışmada uterus büyümesi ve farklılaşması, vücut ağırlığı, serum kolesterolü ve kemik büyümesinde bir değişim saptanmadığı ancak estrogen bağlayan dokularda minimal etkilerinin olabileceği saptanmıştır (80). Bu çalışmada kullanılan dozlar da oldukça düşük dozlardır. Bu resveratrolün bifazik etkisi olabileceği, kullanılan doza bağımlı olarak estrogenik etkisinin farklı olabileceği sonucunu doğurabilir. Veriliş yolu da önemli olabilir. Oral yol ile sc yol ile olduğu kadar yüksek oranda biyoyararlanım olması beklenemez.

Yine çalışmamızda POY geliştirilen sıçanlarda UA/VA oranlarına bakıldığında (Şekil=9), VCD'nin etkisi 10mg/kg resveratrol tarafından anlamlı bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol değerlerine ulaştırılmıştır. Burada resveratrolün etkisinin 17 beta E ün etkisi kadar olduğu izlenmektedir. Ancak 17alfa EE'nin etkisinden anlamlı derecede daha yüksektir. Daha önce yapılan çalışmalarda 17 alfa EE'nin parsiyel estrogenik aktivite gibi genomik etkileri olduğu söylenmiştir (49). Perusquia ve arkadaşlarının (64) 180-220 g ağırlığında dişi Wistar cinsi sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, 17alfa EE'nin nongenomik (antiuterotonik etki) ve genomik (estrogenik/antiestrogenik etki) aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmacılar 17 beta E'nin uterotrofik etkisinin, 17 alfa EE ile önemli ölçüde antagonize edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca bu etkinin doz bağımlı olmadığını da söylemişlerdir. Bu sonuçta bizim çalışmamızda resveratrolün etkisinin 17 alfa EE'nin etkisinden neden yüksek olduğunu açıklar bir sonuç gibi görünmektedir.

Çalışmamızda POY oluşturulan sıçanlarda tamoksifenin, resveratrolün etkisini tamamen ortadan kaldıramadığı görülmektedir. Son yıllarda tamoksifenin farklı doku ve hücrelerde agonist/antagonist olarak rol aldığı bilinmektedir. ER iki transkripsiyonal

alana sahiptir. Bu alanlar AF-1 ve AF-2 olarak belirlenmiştir. AF-1 e tamoksifen bağlandığında bu alan aktive olur ve agonist aktivite ortaya çıkar. Tamoksifen AF-2 ye bağlandığında inhibisyon meydana gelir ve antagonist etki görülür (73,87). Çalışmamızda POY geliştirilmiş sıçanlarda UA/VA değerlerine (Şekil=9) bakıldığında VCD+RES10+TMX verilen grubun ortalama değerlerinin VCD+RES10 verilen grubun ortalama değerlerinden daha düşük olduğu izlenmektedir. Ancak istatistiksel olarak aralarında bir anlamlılık tespit edilememiştir. Bu sonuç da bizi yine resveratrolün estrojenik etkileri olduğu sonucuna götürebilir. Ayrıca VCD+17alfa EE ile VCD+RES10+TMX grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile VCD+RES10+TMX verilen grubun ortalama değerlerinin VCD+ 17alfa EE verilen grubun ortalama değerlerinden daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Buna göre de resveratrolün estrojenik etkilerinin baskın olduğu, 17alfa EE nin ise tamoksifene benzer etkiler gösterdiği söylenebilir.

Resveratrolün estrojenik etkilerini açıklamak açısından erkek sıçanlarda yapılan bir çalışma örnek verilebilir (39). 20 mg/kg resveratrolün oral yolla erkek sıçanlara verilmesinden sonra serum FSH-LH seviyeleri ölçülmüş ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç resveratrolün hipotalamohipofizer aksı etkilediği düşüncesini doğrulamaktadır.

Yaptığımız çalışmada UKA/UYA oranları değerlendirildiğinde, immatür sıçanlarla yapılan çalışmadaki UKA/UYA oranlarında (Şekil=10) özellikle fulvestrant verilen gruplarda bu oranın anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç sadece su retansiyonunun antagonize edildiği ancak protein sentezinde bu etkinin görülmediği şeklinde açıklanabilir. Nitekim nonsteroidal estrojen agonist /antagonisti olduğu düşünülen CP-336,156 adlı madde ile yapılan bir çalışmada, bu maddenin uterin dokularda rehidrasyon üzerindeki bazı etkilerinden söz edilmektedir (44). Ancak bu etki tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir.

POY geliştirilmiş sıçanlarda vücut ağırlığındaki artış oranının (Şekil=13) RES10, 17betaE gruplarında önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Juan ve arkadaşlarının (40) yaptıkları bir çalışmada resveratrol erişkin erkek sıçanlara 20 mg/kg dozda, 28 gün süre ile oral yolla verilmiş ve kontrol grubuna göre vücut ağırlığında anlamlı bir artış tespit

edilmiştir. Bu çalışma metot olarak bizim yaptığımız çalışmadan farklıdır. Ancak resveratrolün 4 gün gibi kısa bir sürede bile puberte dönemindeki sıçanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile ortalama değerler açısından ağırlığı artırmış olması ve bu değerleri 17alfa EE ve 17beta E seviyelerine çıkarmış olması anlamlı bir sonuçtur. Zira VCD verilen grup ile VCD+RES10 verilen grubun karşılaştırmasında POY geliştirilmiş sıçanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Yine Juan ve arkadaşlarının (39) resveratrol ile erkek sıçanlarda yaptıkları başka bir çalışmada FSH ve LH düzeylerinin serum konsantrasyonlarının kontrole göre yüksek bulunmuş olduğu göz önünde tutulursa bu sonuç daha da anlam kazanmaktadır. Turner ve arkadaşlarının (80) yaptıkları çalışmada her ne kadar resveratrolün vücut ağırlığı üzerinde bir etkisi bulunmamış bile olsa burada kullanılan dozlar (1, 4, 10, 40, 100, 1000 µg/kg) göz önüne alındığında dozların çok küçük oranlarda olduğu, etkinin doz ile bağlantılı olduğu düşünülebilir.

İmmatür sıçan çalışmasındaki histolojik değerler ve POY geliştirilmiş puberte dönemindeki sıçan çalışmasındaki histolojik değerler ile UA/VA oranları birbiri ile örtüşmektedir. Biz VCD ile 28 günlük puberte dönemindeki sıçanlarda POY geliştirdik. VCD nin meydana getirdiği follikül kaybının nedeninin apoptosis ve kaspaz-3 aktivitesinin artması olduğu düşünülmektedir (78). Resveratrol de antikanserojen etkilerini bu yollarla gösterebilmektedir (37). Bizim yaptığımız çalışmada VCD+RES 10 grubunda hematoksilen-eosinle boyanan histolojik kesitlerde follikül sayılarının artmış olduğu görüldü. Ancak bununla ilgili istatistiksel bir çalışma yapılmadı. Bu yüzden bu artışın anlamlı olup olmadığını söylemek zordur. Ancak Thompson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (78), 28 günlük sıçanlara, 80 mg/kg VCD ip yolla, 0,1 mg/kg 17 beta E sc yolla, 0,1mg/kg genistein ip yolla verilmiş ve primer follikül sayılarının VCD grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma gösterdiği ancak VCD ile birlikte 17beta E ve genistein verilen grupların kontrol ile aralarında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada kaspaz 3 aktivitesi de değerlendirilmiş ve VCD verilen grupta kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre arttığı ancak VCD+genistein verilen grupta bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda resveratrolün etkisi ile bu çalışmada genisteinle gösterilen sonuçlar örtüşmektedir. Bu araştırmacılar genisteinin kaspaz-3 aktivitesini doğrudan etkilemediği

halde VCD nin bu enzim üzerinde oluşturduğu etkiyi ortadan kaldırabildiğini öne sürmüşlerdir. Genistein ve resveratrol benzer fitoestrogenler olması nedeniyle bu açıdan benzer davranış gösterebildiği düşünülebilir.

Kemik Dansitometre sonuçları her ne kadar anlamlı olmasa bile POY geliştirilmiş sıçanların kan analizlerinde Vitamin D sonuçları değerlendirildiğinde bu değerlerdeki değişimin POY geliştirilen sıçanlarda UA/VA oranı sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir. Ke ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (44) nonsteroidal estrogenik agonist/antagonist etkileri olduğu düşünülen CP-336,156 adlı bir madde 28 gün süre ile 5 aylık ovariektomize dişi sıçanlara verilmiş ve kemik dansitometresinde kontrol grubuna göre anlamlı yükselmeler saptanmıştır. Ancak burada deneye alınan sıçanlar yaş olarak oldukça büyüktür. Ayrıca madde verilme süresi de oldukça uzundur. Bizim çalışmamızda dişi sıçanların 28 günlük olduğu ve 4 gün süre ile tedavi edildiği düşünülürse bu sonucun kaçınılmaz olacağı ortaya çıkar. Belki daha uzun süre ile tedavi ile kemik dansitometresinde anlamlı sonuçlara ulaşılabilir. Zira estrogenik bileşiklerin in vitro (43,76) ve in vivo olarak (10,23,75) multipl iskelet koruyucu etkileri ve postmenopozal kadınlarda osteoporoz a karşı pozitif etkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır (50).

Estradiol sonuçları göz önüne alındığında 20 mg/kg dozda resveratrolün estradiol düzeyinin,10 mg/kg dozdaki resveratrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmektedir. Bu sonuç da resveratrolün estrogenik aktivitesinin literatürlerde izlenen bifazik etkileri ile örtüşmektedir. Biz diğer çalışmalarda bu dozu denemedik. Ancak estrogenik aktivite açısından 10 mg/kg doz en uygun sonucu vermektedir. POY geliştirilmiş sıçanlarda estradiol değerlerine bakıldığında, VCD+RES10+TMX ve VCD+17betaE verilen gruplarda estradiol değerlerinin kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı gözlenmektedir ki bu sonuçta bizim yaptığımız çalışmanın amacı ile uyumlu bir sonuçtur. Bütün bu estradiol sonuçlarına bakıldığında resveratrolün parsiyel agonist etki gösterdiği düşünülür.

6-SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada resveratrolün estrojenik etkilerinin değerlendirilmesi, immatür dişi sıçan çalışması ve POY geliştirilmiş puberte dönemindeki dişi sıçan çalışması olarak iki aşama halinde planlanmıştır. Amaç, ER'lerinin bulunduğu bilinen dokularda resveratrolün agonist ve/veya antagonist etkilerini incelemektir. Bu amaçla her iki aşamada UA/VA oranları, UKA/UYA oranları, VA oranları, uterus ve over histolojik değerlendirmesi, kemik dansitometresi, kan estradiol ve D vitamini düzeyleri incelenmiştir. İmmatür sıçanlarda UA/VA oranları değerlendirmesinde resveratrolün UA/VA oranını 17alfa EE ye benzer bir şekilde artırdığı ve en düşük anlamlı etkinin 10 mg/kg resveratrol dozunda olduğu görülmüştür. Bu etki tamoksifen ile azaltılmadığı halde, fulvestrant tarafından anlamlı bir şekilde antagonize edilmiştir. Çalışmamızda POY oluşturulan sıçanlarda tamoksifenin, resveratrolün etkisini tamamen ortadan kaldıramadığı görülmektedir. POY geliştirilmiş sıçanlarda UA/VA değerleri açısından VCD+RES10+TMX verilen grubun ortalama değerlerinin, VCD+RES10 verilen grubun ortalama değerlerinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Estradiol sonuçları açısından değerlendirildiğinde 20 mg/kg dozda resveratrolün estradiol düzeyini düşürdüğü görülmektedir. POY geliştirilmiş sıçanlarda estradiol değerlerine bakıldığında, VCD+RES10+TMX ve VCD+17beta E verilen gruplarda estradiol değerlerinin kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı gözlenmektedir. Bu çalışmanın en önemli sonucu resveratrolün estrojenik aktivite yönünden dozunun önemli olduğudur.

Bütün bu sonuçlara bakıldığında resveratrolün estrojen modülatörü olarak etki gösterdiği düşünülür. Ancak özellikle etki mekanizmasının aydınlatılması açısından daha ayrıntılı ve reseptör ve ikinci haberciler düzeyinde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

7- KAYNAKLAR

1. **Adashi, EY, 1994.** The climacteric ovary as a functional gonadotropin driven androgen producing gland. *Fertil Steril.* 62(1), 20-27 p.
2. **Addo S, Yates RA, Laight A. 2002.** A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. *Br J Cancer.* 87:1354-1359 p.
3. **Bacciottini L, Falchetti A, Pampaloni B, Bartoloni E, Carossino AM, Brandi ML. 2007.** Phytoestrogens: food or drug. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 4(2);123-130 p.
4. **Basly JP, Marre Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. 2000.** Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E) and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 66:769-77 p.
5. **Belguendouz L, Fremont L, Linard A. 1997.** Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 53, 1347-1355.p
6. **Bhat KP, Lanvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 2001.** Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res.* 61:7456-63 p.
7. **Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP et al. 2007.** Phase 1 dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:1246-1252 p.
8. **Bour J.A, Pearson K.J, Price N.L, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A et al. 2006.** Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444, 2006, 337-342 p.
9. **Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. 2000.** Resveratrol acts as a Mixed Agonist/antagonist for Estrogen Receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 141, Cilt 10, 3657-67 p.
10. **Brzezinski A, Debi A. 1999.** Phytoestrogens: The natural selective estrogen receptor modulators? *J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 85:47-51 p.
11. **Chanvitayapongs S, Dranczynska-Lusiak B, Sun AY. 1997.** Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport.* 8:1499-1502 p.
12. **Cottard C.H, Nivet-Antoine V, Laguilher-Morizot C, Beaudeau JL. 2010.** Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol.Nutr.Food Res.* 54, 7-16 p.
13. **Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. 2004.** Resveratrol associated renal toxicity. *Toxicol.* 82:614-619 p.
14. **Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Patrizia G, Zappia V, Della Ragione F. 2007.** Resveratrol. *Cell Cycle.* 6:20, 2495-2510 p.
15. **Das S, Lin H.S, Ho P.C Ng KY. 2008.** The impact of Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. *Pharmaceutical Research.* 11, 25 p.
16. **De Vos M, Devroey P, Fause B C J. 2010.** Primary ovarian insufficiency. *Seminars.* 376:911-21 p.
17. **Dukes M, Miller D, Wakeling AE, Waterton JC. 1992.** Antiuterotrophic effects of a pure antioestrogen, ICI 182,780: magnetic resonance imaging of the uterus in ovariectomized monkeys. *J Endocrinol.* 135: 239-247 p.

18. **Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. 1996.** The vasküler protective effects of estrogen. *The FASEB Journal*. 10;615-624, p.
19. **Feng J, Wu Q, Lu YF. 2008.** Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's Disease in rats. *European Journal of Pharmacology*. 600;78-82 p.
20. **Fremont L. 2000.** Biological effects of resveratrol. *Life Science*. 8, 663-673 p.
21. **Frenkel E.N, Waterhouse A.L, Kinsella J.E. 1993.** Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*. 341, 1103-1104 p.
22. **Freyberger A, Hartmann E, Hildebrandt H, Krötlinger F. 2001.** Differential response of immature rat uterine tissue to estradiol and the red wine constituent resveratrol. *Arch Toxicol*. 74(11):709-15 p.
23. **Gallagher, JC. 1988.** Drug therapy of osteoporosis: Calcium, estrogen and vitamin D. *Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management*. Vol:1 S:389-401 p.
24. **Gehm B.D, McAndrews. 1997.** Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 14138-14143 p.
25. **Gonzales AM, Orlando RA. 2008.** Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor- κ B-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr Metab*. 5:17 p.
26. **Greaves P, Goonetilleke R, Numm G, Topham J, Orton T. 1993.** Two year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderly Park Wistar-derived rats. *Cancer Res*. 53;3919-3924 p.
27. **Gu X, Chu Q, O'Dawyer M, Zeece M. 2000.** Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 881, 478-481 p.
28. **Guarente L, Picard F. 2005.** Calorie restriction-The SIR2 connection. *Cell*. 120;473-482 p.
29. **Hoyer P, Sipes G. 2007.** Development of Animal Model For Ovotoxicity Using 4-Vinylcyclohexene: A Case Study. *Birth Defects Res*. 80:113-125 p.
30. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tamoksifen.jpg> .
31. <http://en.diagnosispro.com>.
32. <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/vinylcyclohexenedioxierecognition.html>.
33. <http://www.powersupplements.com/resveratrol>.
34. **Hu X, Christian P, Sipes G, Hoyer PB. 2001.** Expression and Redistribution of Cellular Bad, Bax, and Bcl-xL Protein Is Associated. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*. 65, 489-1495 p.
35. **Hu X, Christian PJ, Thompson KE, Sipes IG, Hoyer PB. 2001.** Apoptosis induced in Rats by 4-Vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biology of reproduction*. 65: 87-93 p.
36. **Jang M, Cai E.N, Udeani G.O. 1997.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275, 218-220 p.
37. **Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L et al. 2005.** Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther*. 4:554-561 p.
38. **Jordan, VC. 2007.** New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention. *Steroids*. 72:829-42 p.

39. **Juan EM, Gonzales-Pons E, Munuera T, Ballester J. 2005.** trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output In Healthy Rats. . *The Journal of Nutrition.* 135:757-760 p.
40. **Juan ME, Vinardel MP, Planas JM. 2002.** The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J.Nutr.* 132:257-260 p.
41. **Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. 1998.** Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 27:1265-1279 p.
42. **Kayaalp, O. 2002.** Estrojenler, projestinler ve antagonistleri. *Tibbi Farmakoloji.* 10.Baskı 82.Konu, 2002, 1314-40 s.
43. **Kaye AM, Weisman Y, Harell A, Somjen D. 1990.** Hormonal stimulation of bone cell proliferation. . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37:431-435 p.
44. **Ke HZ, Paralkar VM, Grasser WA et al. 1998.** Effects of CP-336,156, a New, Nonsteroidal Estrogen Agonist/Antagonist, on bone, Serum Cholesterol, Uterus and Body Composition in Rat Models. *Endocrinology.* Vol. 139, No. 4 2068-2076 p.
45. **Kedar RP, Bourne TH, Powles TJ, Collins WP, Ashley SE, Cosgrove DO. 1994.** Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention triad. *Lancet.* 343:1318-1321 p.
46. **Kocatürk AP, Özenci Kavas G. 2007.** Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Trece Elem Electrolytes.* 24(2), 112116 s.
47. **Loose SD, Stancel GM, 2006.** Estrogens and Progestins. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Chapter 57;1541-71 p.
48. **Lu R, Serrero G. 1999.** Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J.Cell.Physiol.* 179:297-304 p.
49. **Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winnekar RC. 1997.** Characterization of ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology.* 138:1552-1558 p.
50. **Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. 2002.** Sex steroids and bone. *Recent Progr Horm Res.* 57:385-409 p.
51. **Marjoke H, Houtman R, Poortman J, Groot M, Maliepaart C, Peijnenburg A. 2007.** Estrogenic Effect in Immature Rat Uterus after Dietary Exposure to Ethinylestradiol and Zearalenone Using a Systems Biology Approach. *Toxicological Sciences.* 99(1);103-314 p.
52. **Mayer L, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, Mc Cuskey MK et al. 2002.** Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats. *Reproductive Toxicology.* 16:775-781 p.
53. **Mgbonyebi OP, Russo J. 1998.** Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int.J.Oncol.* 12, 865-869 p.
54. **Morais de Sa E, Pereira PJ, Saraiva MJ, Damas AM. 2004.** The Crystal Structure of Transthyretin in Complex with Diethylstilbestrol A PROMISING TEMPLATE FOR THE DESIGN OF AMYLOID INHIBITORS*. *The Journal of Biological Chemistry.* 10:1074 p.
55. **Moutsatsou P. 2007.** The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding . *Hormones.* 6(3);173-193 p.

56. **Muhammad FS, Goode AK et al. 2009.** Effects of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide on Peripubertal and Adult Sprague-Dawley Rats. . *Ovarian,Clinical and Pathologic Outcomes.* 59(1);46-59 p.
57. **Olas B, Nowak P,Kolodziejczyk J, Ponczek M,Wachowicz B. 2006.** Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxyxynitrite. *J. Nutr. Biochem.* 17, 96-102 p.
58. **Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI, 2004.** Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer.* 90;2-6 p.
59. **Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC, 2008.** Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *NIH Public Access.* 74(13);1656-1665 p.
60. **Özer, Ö. 2006.** Menapoz ve fitoöstrojenler. *Tez.* 2006, 3-7 s.
61. **Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E . 2003.** Red Wine Polyphenolics Increase LDL Receptor Expression and Activity and Suppress the Secretion of ApoB100 from Human HepG2 Cells. *j.Nutr.* 133, 700-706 p.
62. **Paraskevi M. 2007.** The Spectrum of phytoestrogens in nature:our knowledge is expanding . *Hormones.* 6(3)/173-193 p.
63. **Pearson JK, Baur JA, Lewis KN et al. 2010 .** Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary without extending life span. *Eur J Pharmacol .* 633:78-84, p.
64. **Perusquia M, Navarrette E. 2005.** Evidence that 17 alpha estradiol is biologically active in the uterine tissue:Antiuterotonic and antiuterotrophic action. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3:30 p..
65. **Pirola L, Frojdö S. 2008.** Resveratrol:One Molecule,Many Targets. *Life.* Vol 60(5), 323-332 p.
66. **Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, Tidy A, Ashley S. 1996.** Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal. *J Clin Oncol.* 14:78–84 p.
67. **Prushotham A, Schug TT, Li X. 2009** SIRT1 performs a balancing act on the tight-rope toward longevity. . *AGING.* Vol 1, 669-673 p.
68. **2010 V15,N2.** Resveratrol Monograph. *Alternative Medicine Review.* V15,N2, s. 152-158 p.
69. **Sanchez-Fidalgo S, Cardeno A, Villegas I ,Talero E, de la Lastra CA. 2010.** Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 633:78-84 p.
70. **Sayın O, Arslan N, Güner G. 2008.** Resveratrol ve kardiyovasküler sistem. *Türk Biyokimya Dergisi.* 33(3):117-121 s.
71. **Shaio WK, Sipes IG, Hoyer PB. 1999.** Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. *Reproductive Toxicology.* Vol 13, 67-75 p.
72. **Sinclair DA, Komaroff AL. 2006.** Can we slow aging? *Newsweek.* 148(24):80,82,84 p.
73. **Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. 1997.** Coactivatorand corepressor regulation of the mixed antiestrogen,4-hydroxytamoxifen. . *Mol Endocrinol.* 11:657-666 p.

74. **Somjen D, Katzburg S, Sharon O, Grafi-Kohen E, Stern N. 2011.** The effects of Estrogen Receptors alfa-and beta -Specific Agonists and Antagonist on Cell Proliferation and Energy Metabolism in Human Bone Cell line . *Journal of Celluler Biochemistry* . 112;625-632 p.
75. **Somjen D, Weisman Y, Harell A, Berger E, Kaye AM. 1989.** Direct and sex spesific stimulation by sex steroids of creatine kinase activity and DNA synthesis in rat bone. . *Proc Natl Acad Sci*. 86:3361-3363 p.
76. **Somjen D, Weisman Y, Mor Z, Harell A, Kaye AM. 1991.** Regulation of proliferation of rat cartilage and bone by sex steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 40;717-723 p.
77. **Sun AY, Chen YM, James-Kracke M, Wixom P, Cheng Y. 1997.** Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochem*. 22:1187-1192 p.
78. **Thompson KE, Sipes G, Greenstein BD, Hoyer PB. 2002.** 17 Beta Estradiol afforts Protection aganist 4-Vinylcyclohexene Diepokside -Induced Ovarian Follicle Loss in Fisher -344 Rats. *Endocrinology*. 143(3):1058-1063 p.
79. **Tosun İ, Karadeniz B. 2005.** Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *OMÜ.Zir.Fak Dergisi*. 20, 78-83 s.
80. **Turner RT, Evans GI, Zhang M, Maran A, Sibonga JD. 1999.** Is Resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*. 140:50-4 p.
81. **Vaz-da-Silva A, Loureiro AI, Falcao A, Nunes T et al. 2008.** Efeect of food on the pharmacocinetic profile of trans resveratrol,. *J Clin Pharmacol*. 46:564-570 p.
82. **Wakeling AE, Bowler J. 1987.** Steroidal pure antioestrogens. *J Endocrinol*. 112: R7–R10 p.
83. **Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. 1991.** A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*. 51: 3867–3873 p.
84. **Walle T, Hsieh F, Delegge MH, Oatis JE, Walle UK. 2004.** High absorpction but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 32;1377-1382 p.
85. **Wolter F, Ulrich S, Stein J. 2004.** Molecular Mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer. *J.Nutr*. 134, 3219-3222 p.
86. **Zengin, A. 2007.** Siçan frenik sinir-hemidiyafram preparatında antioksidan resveratrol, kateşin ve epikateşin etkileri. *Tez*. 10-11 s.
87. **Zhang H, Mc Elrath T, Tong W, Pollard JW. 2005.** The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *J Endocrinol* . 184:129-140 p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dr. Fikriye Yasemin ÖZATİK

Meslek: Doktor

Doğum yeri ve yılı: Ankara 22.03.1966

Medeni Durumu: Evli

EĞİTİM:

İlkokul: Emine Akçakaya İlkokulu Kayseri

Orta okul: Osmangazi Ortaokulu Eskişehir

Lise: Ahmet Kanatlı Lisesi Eskişehir

Üniversite: 1) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

2) Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi

Çalışma Ekonomisi ve Endüstri İlişkileri Bölümü Öğrencisi

Doktora: Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Sertifikalı Eğitimler:

İş Yeri Hekimliği Sertifikası

Temel Yaşam Desteği Uygulayıcı Sertifikası

Çocuklarda İleri Yaşam Desteği Uygulayıcı Sertifikası

Travma İleri Yaşam Desteği Uygulayıcı Sertifikası

İl Eğitimcileri Eğitim Formasyonu ve Uyum Eğitimi Eğitimci Eğitimi Sertifikası

Aile hekimliği Eğitimci Eğitimi Sertifikası

Aile Planlaması Klinik Uygulama Becerilerinin Standardizasyonu Ve Klinik Becerilerin Geliştirilmesi Eğitimci Eğitimi Sertifikası

ICD 10 Eğitimci Eğitimi Sertifikası

Hayvan deneyleri yerel etik kurulu deney hayvanları kullanım sertifikası

Klinik Araştırmalarda Etik Yaklaşım Kursu

Eğitmenlik, Eğitimci eğitmenliği

Yabancı dil: İngilizce

Bilgisayar: Microsoft Office uygulamaları

MESLEK YAŞAMI:

Mecburi Hizmet: Bucak Devlet Hastanesi –Bucak/Burdur 1990-1991

1991 yılından beri Sağlık Bakanlığı Eskişehir Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinde çalışıyorum.